



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio de la fagocitosis de conidios  
de *Sporothrix schenckii* en la línea  
celular de macrófagos U-937.

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

Q.F.B. CRISTINA CORONEL CRUZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. BAYDÉE TORRES GUERRERO



MÉXICO, D.F.

COORDINACIÓN

NOVIEMBRE, 2005

M: 349538



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

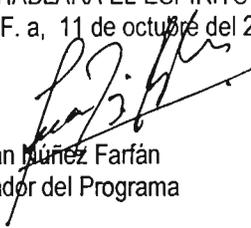
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de junio del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **CORONEL CRUZ CRISTINA** con número de cuenta **503005308** con la tesis titulada: **Estudio de la fagocitosis de conidios de Sporothrix schenckii en la línea celular de macrófagos U-937**, bajo la dirección del(a) **Dra. Haydeé Torres Guerrero**.

Presidente:	Dr. Alfonso González Noriega
Vocal:	Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Secretario:	Dra. Haydeé Torres Guerrero
Suplente:	Dra. María del Rocío Reyes Montes
Suplente:	Dr. Francisco Vianney Ortiz Navarrete

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a, 11 de octubre del 2005



Dr. Juan Muñoz Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme distinguido como becaria para la realización de la maestría.

Comité tutorial integrado por:

Dra. Haydée Torres Guerrero

Dr. Alfonso González Noriega

Dr. Francisco Vianney Ortiz Navarrete

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Genética y Biología Molecular de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Haydée Torres Guerrero.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres Isabel Cruz García y Miguel Angel Coronel Hernández  
Gracias por su ejemplo eterno de superación.

A mi esposo Ignacio González Sánchez  
Gracias eternamente por tu apoyo incondicional en la realización experimental de esta tesis y por alentarme a continuar en los momentos más difíciles.

A mis hermanos Diana, Rocio, Miguel y Fernando  
Gracias por todas las vivencias compartidas.

Dedico especialmente esta tesis a los Doctores Juan Bolivar, Andrés Castel y a la Dra. Patricia Tato por compartir su equipo de cultivo celular incondicionalmente, sin ellos no habría sido posible la realización de esta tesis.

Al Biólogo José Luis Ventura Gallegos del Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Gracias por haber compartido tu experiencia en el manejo del cultivo celular y por la infinidad de ocasiones que nos donaste la línea celular U-937.

A la Dra. Beatriz Gómez y a las integrantes del laboratorio las Doctoras Rocio y Rosa Elena por su apoyo y amabilidad al prestarme su equipo para la realización de esta tesis.

A los integrantes del laboratorio del Dr. Vianney Ortiz Navarrete: Benjamín, Irlanda, Penélope, Roberto, Flaviano. Gracias por su ayuda incondicional y por las enseñanzas de diversas metodologías.

A Edith Trejo Gómez.  
Gracias por tu comprensión en los momentos difíciles, por contar con tu amistad y apoyo incondicional.

A la Dra. Lilia Roberts, y a los integrantes del laboratorio: Sandra, Antonio, José.

A la Dra. Celia Alpuche Aranda por su apoyo incondicional para la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme distinguido como becaria para la realización de la maestría.

A los Doctores Haydée Torres Guerrero, Vianney Ortiz Navarrete y Alfonso González Noriega por haber constituido no solo mi comité tutorial, sino parte de mi formación académica con sus críticas siempre oportunas.

## ABREVIATURAS

Abs	anticuerpos
BSA	albúmina de suero bovino
C1q	componente proteico de la vía clásica del complemento
c.b.p.	cuanto baste para
CO <sub>2</sub>	bióxido de carbono
CR	receptor del complemento
DMSO	dimetilsulfóxido
ELISA	inmunoensayo enzimático
Fc	parte estructural de la IgG denominada fragmento cristalino
FcRs	receptor del Fc
Fig.	figura
FITC	isotiocianato de fluoresceína
°C	grados centígrados
g	gramos
H	cadena pesada de la inmunoglobulina
h	horas
I	índice fagocítico
IgGs	inmunoglobulinas isotipo G
IgM	inmunoglobulina isotipo M
IL-	interleucina
IFN	interferón
KDa	kilodalton
L	cadena ligera de la inmunoglobulina
LPS	lipopolisacáridos
MØ	macrófago
µl	microlitros
µm	micrómetros
µg	microgramos
ml	mililitro
MHC	complejo principal de histocompatibilidad
Mg	miligramos
Min	minutos
MOI	multiplicidad de infección
N	normal
NH <sub>4</sub> Cl	cloruro de amonio
PBS	solución amortiguadora de fosfatos
pH	potencial de hidrógeno
PMA	phorbol12-myristato 13-acetato
rpm	revoluciones por minuto
SFB	suero fetal bovino
<i>S. schenckii</i>	<i>Sporothrix schenckii</i>
TH	células T colaboradoras

TNF  
%

factor de necrosis tumoral  
por ciento

## RESUMEN

La esporotricosis es la micosis subcutánea más frecuente en México. Su agente causal es el hongo *Sporothrix schenckii*, patógeno dimórfico que principalmente afecta la piel y vasos linfáticos, en raras ocasiones se presenta en articulaciones, huesos, sistema nervioso central y tracto genitourinario (Ruíz, et al., 1996). La esporotricosis se origina por la inoculación traumática de hifas o conidios o ambos en el tejido del hospedero. Una vez que el hongo se ha establecido en el tejido la fase parasitaria de levaduras se desarrolla en el sitio de infección.

Durante la infección temprana con *S. schenckii* destaca la participación de fagocitos profesionales como macrófagos y neutrófilos. Estas células son esenciales por que a través de la secreción de citocinas y la presentación de antígeno son capaces de activar la inmunidad celular. La importancia de la inmunidad celular se ha documentado en la defensa del hospedero contra hongos como: *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans* y *Sporothrix schenckii*.

En el presente trabajo se inició la caracterización del proceso de fagocitosis de conidios hialinos de *Sporothrix schenckii* sin opsonizar y bajo distintas condiciones de opsonización. También se observó el proceso de transición dimórfica del hongo en la línea celular de macrófagos U-937.

Los resultados mostraron que los conidios hialinos de *Sporothrix schenckii* no opsonizados son fagocitados en baja proporción por macrófagos de la línea celular U-937. La fagocitosis incrementó significativamente cuando los conidios fueron opsonizados con concentraciones crecientes de suero completo anti-*S. schenckii* e IgGs anti-*S. schenckii*. Esto sugiere que en esta línea celular de macrófagos existe un bajo número de receptores para los antígenos presentes en la pared celular de los conidios de este hongo.

Por otro lado en la transición dimórfica de los conidios del hongo en macrófagos U-937 se observó la presencia de hifas como fase intermedia en el dimorfismo y de levaduras gemantes, lo que nos permitió concluir que una de las células donde se lleva a cabo este cambio morfogénico son los macrófagos, sugiriendo que el hongo patógeno *Sporothrix schenckii* es capaz de evadir la respuesta inmune.

## ABSTRACT

Sporotrichosis is a chronic benign mycosis. The aetiologic agent is the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. When hyphae or conidia are introduced at sites of cutaneous trauma the fungus develops into budding yeast which produces a lesion at the site of injury. It affects cutaneous and subcutaneous tissues with a marked tendency to spread along the lymphatic system. Occasionally has been reported in mucous membranes and viscera, musculoskeletal tissue, the eye and central nervous system (Lurie, 1971; Ruíz, et al., 1996).

The elimination of *S. schenckii* by macrophages and neutrophils in the early state of infection, depends on phagocytosis and on the release of toxic agents, such as reactive oxygen and nitrogen intermediates. These responses are controlled in part by soluble cytokines produced by macrophages. The importance of cell-mediated immunity has been documented in the host defense against infection with various fungi including *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans* and *Sporothrix schenckii*.

In the present study we started the characterization of *S. schenckii* conidia phagocytosis under different opsonization conditions, the macrophage cell line used was U-937. Dimorphic transition in these cells is also reported.

The results suggest that U937 has small amounts of receptors for the fungal cell wall antigens since phagocytosis was not clearly observed unless increasing amounts of complete anti - *S. schenckii* serum or purified IgG were used as opsonins.

Some phagocytosed conidia could be induced to its dimorphic transition inside the U-937 macrophages. As was reported before by Travassos (Travassos, et al., 1978) small hyphae were observed as an intermediate phase to budding yeast cells. These results suggest that some conidia can inhibit or escape to the phagosome maturation.

# ÍNDICE

	Página
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
1. Generalidades de <i>Sporothrix schenckii</i>	1
2. Factores de virulencia	2
3. Inmunología y patología de la esporotricosis	5
4. Fagocitosis	6
<b>HIPÓTESIS</b>	9
<b>OBJETIVOS</b>	10
<b>ANTECEDENTES</b>	11
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	13
<b>METODOLOGÍA</b>	
1. Mantenimiento de la línea celular U-937	14
1.1 Diferenciación a monocitos U-937	14
1.2 Congelamiento y descongelamiento de monocitos U-937	14
2. Condiciones de crecimiento de conidios de <i>S. schenckii</i>	14
3. Preparación de antígenos de <i>S. schenckii</i>	14
3.1 Producción de anticuerpos contra <i>S. schenckii</i>	15
4. Opsonización de conidios de <i>S. schenckii</i>	15
4.1 Obtención de índices fagocíticos por fluorescencia en macrófagos U-937	15
4.2 Viabilidad de los macrófagos	16
5. Análisis estadístico	16
6. Transición dimórfica de <i>S. schenckii</i> en macrófagos U-937	16
6.1 Dimorfismo de <i>S. schenckii</i> en macrófagos U-937 en presencia de cloruro de amonio	16
6.2 Inmunofluorescencia	17

## **RESULTADOS**

### **CAPITULO I. FAGOCITOSIS**

1. Estandarización de la cuantificación fagocítica por fluorescencia	19
2. Cinética de fagocitosis de conidios hialinos de <i>S. schenckii</i> en macrófagos U-937	20
3. Determinación de la actividad fagocítica incrementando la multiplicidad de infección de los conidios hialinos de <i>S. schenckii</i>	21
4. Determinación de la participación del suero completo y el complemento en la fagocitosis de los conidios hialinos por macrófagos U-937	22
5. Efecto de la opsonización con IgGs sobre la fagocitosis de conidios hialinos de <i>S. schenckii</i> en macrófagos U-937	24

### **CAPITULO II. TRANSICIÓN DIMÓRFICA.**

1. Transición dimórfica de conidios hialinos de <i>S. schenckii</i> en macrófagos U-937	27
1.1. Las hifas de <i>S. schenckii</i> son capaces de atravesar la membrana celular del macrófago sin afectar su viabilidad	32
2. Transición dimórfica de conidios de <i>S. schenckii</i> en macrófagos U-937 en presencia de cloruro de amonio	33
3. Viabilidad de los macrófagos	33

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
------------------	-----------

<b>CONCLUSIONES</b>	<b>39</b>
---------------------	-----------

<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>40</b>
---------------------	-----------

<b>APÉNDICE</b>	<b>44</b>
-----------------	-----------

# INTRODUCCIÓN

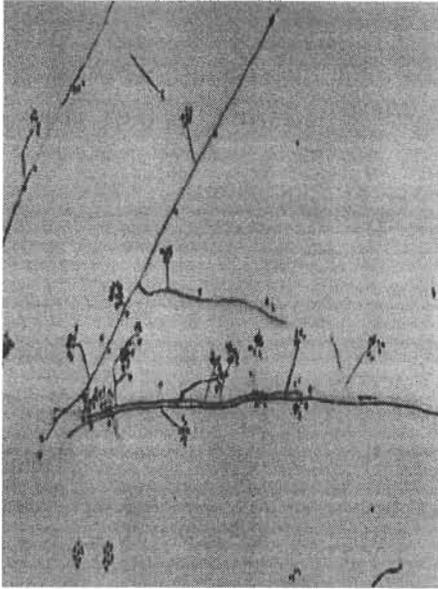
## 1. GENERALIDADES DE *Sporothrix schenckii*.

La esporotricosis es una micosis subcutánea, su agente etiológico es el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*, ampliamente distribuido en la naturaleza en forma de micelio y conidios sobre plantas y tierra. La esporotricosis es una infección subcutánea de naturaleza crónica y granulomatosa. Sin embargo, en su forma sistémica el hongo puede propagarse a pulmón, ojos, huesos, sistema nervioso central y tracto genitourinario (Ruíz, et al., 1996) Recientemente, se ha demostrado que la esporotricosis osteoarticular y meningeal se asocia con pacientes con inmunosupresión (Castro, et al., 2003). La esporotricosis se adquiere por inoculación traumática de hifas y conidios. En el tejido infectado el hongo se diferencia a la fase parasitaria de levadura y puede propagarse a otros tejidos. La esporotricosis es de evolución subaguda o crónica, presentando diferentes formas clínicas: localizada, linfangítica y diseminada dependiendo del tamaño del inóculo inicial, virulencia, profundidad de la inoculación traumática, tolerancia térmica del hongo, y respuesta inmune del hospedero entre otras (Fernández, et al., 1999).

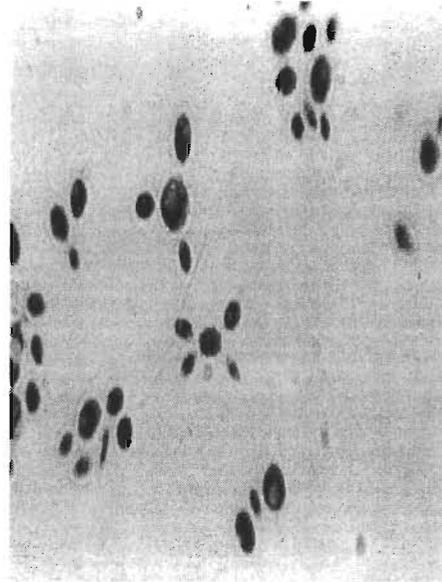
Este hongo *in vitro* a 28°C crece como micelio y forma macroscópicamente colonias membranosas limitadas de una coloración que puede ir desde crema hasta negra dependiendo de la cepa y el medio de cultivo. Microscópicamente se observan hifas septadas, hialinas de 1-2 µm de diámetro y conidios ovales, piriformes o elongados de 1.5-3 por 3-6 µm. Los conidios emergen solos o en grupo a lo largo de la hifa (radulosporas) o sobre un simpodio apical (simpodulosporas) (Fig. 1). Algunas cepas de *S. schenckii* forman conidios pigmentados esféricos o triangulares de 2.4-3.7 µm de diámetro que tienen paredes delgadas. Este hongo presenta dos tipos de conidios: hialinos que carecen de pigmento y pigmentados, que en los medios adecuados sintetizan polímeros de melanina que se localizan en la superficie de la pared celular.

Las colonias que se obtienen de la forma parasitaria o levaduriforme del hongo crecen en medios complejos a temperaturas de 35°C a 37°C y presentan una consistencia cremosa de apariencia húmeda. La morfología microscópica está formada por células fusiformes u ovoides, uni o bigemantes de un diámetro de 2.5 a 5 por 3.5 a 6.5 µm que se multiplican por gemación simple o múltiple. Las formas de la levadura emergen de los lados y puntas de la hifa. Los conidios generalmente germinan en hifas cortas que bajo las condiciones apropiadas pueden originar levaduras (Fig. 2).

*In vivo* se observa una morfología compleja con predominancia de levaduras redondas, ovales que pueden llegar a ser en forma fumagide conforme la lesión incrementa en tamaño. Esta última se multiplica activamente alrededor de las lesiones supurativas. Las observaciones de levaduras intracelulares *in vivo* en pacientes son posibles por inmunofluorescencia encontrándose en macrófagos y células gigantes.



**Fig. 1** micrografía de la fase infectiva de *Sporothrix schenckii* (hifas y conidios).



**Fig. 2** micrografía de la fase parasitaria (levadura) de *Sporothrix schenckii in vitro*.

## **2. FACTORES DE VIRULENCIA.**

Los hongos patógenos tienen varios factores que les permiten crecer en condiciones adversas dentro del hospedero, favoreciendo el establecimiento de la infección y contribuyendo al desarrollo de la enfermedad. Estos factores son conocidos como factores de virulencia los cuales favorecen la colonización, diseminación y la capacidad para sobrevivir en ambientes hostiles y eludir los mecanismos de respuesta inmune del hospedero.

La virulencia se define como un componente del patógeno que daña al hospedero existiendo una interrelación compleja entre el organismo infectante y el hospedero. La patogénesis involucra un proceso dinámico de ambos organismos. Los hongos patógenos pueden dividirse en dos clases generales: patógenos primarios y patógenos oportunistas. Los primeros causan enfermedad en pacientes no inmunocomprometidos, mientras que los oportunistas toman ventaja del hospedero inmunocomprometido para causar la infección. Para algunos hongos el ambiente puede ser su reservorio (*Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*), otros son comensales en organismos sanos (*Candida albicans*). Pocos hongos son patógenos profesionales, la mayor parte existen como saprófitos o como comensales, coexistiendo con el hospedero sin consecuencias negativas. No obstante, algunos son capaces de infectar hospederos sanos y causar micosis sistémicas severas (*Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*) (Jo-Anne, et al., 2001).

## Entre los principales factores de virulencia se encuentran:

### 1) Termotolerancia.

Es la capacidad para crecer a 37°C o dentro de un intervalo de fiebre 38-42°C, requerimiento claramente importante para la infección sistémica. La resistencia a los cambios de temperatura se encuentra relacionada con proteínas de choque térmico, estas proteínas parecen tener un papel no solo en la termoadaptación, sino también en la transición micelio a levadura en hongos dimórficos. Este fenómeno se ha observado en *C. neoformans*, *H. capsulatum* y *S. schenckii* (Kurokawa, et al., 1998).

### 2) Factores de penetración y diseminación.

El primer paso en la infección fúngica es la introducción del agente al hospedero. La infección puede estar limitada al portal de entrada o llegar a ser sistémica diseminándose vía hematógena o rutas contiguas. El movimiento de la superficie infectante al torrente sanguíneo requiere daño al tejido, este puede ocasionarse por la presencia, penetración mecánica o necrosis en tejido nuevo. Los hongos pueden también propagarse del sitio de infección a través del hospedero por el mecanismo de fagocitosis, *Histoplasma capsulatum* es fagocitado por macrófagos, pero no es destruido multiplicándose dentro del fagosoma, una característica compartida por *Blastomyces dermatitidis* (Jo-Anne, et al., 2001).

### 3) Evasión.

Los patógenos intracelulares han evolucionado diversos mecanismos para sobrevivir al ambiente hostil del hospedero. Una vez que los patógenos se han internalizado y se han protegido del sistema inmune del hospedero tienen acceso a los nutrientes preformados. Los diversos mecanismos tienen el común denominador de permitir al patógeno evitar su degradación y crear un nicho favorable dentro del cual pueden crecer y replicarse. Algunos hongos patógenos también evaden la degradación fagocítica por mecanismos que involucran pH, *Histoplasma capsulatum* logra modular el pH interno del fagosoma manteniéndolo en un intervalo de 6 a 6.5, en contraste el pH ácido del fagolisosoma favorece la supervivencia y formación del tubo germinal de *Candida albicans* y la capacidad de *Cryptococcus neoformans* para sobrevivir dentro de los macrófagos también se ha asociado con la acidificación del pH del fagolisosoma (Ibrahim, et al., 2003).

### 4) Factores necróticos.

Los factores necróticos permiten romper la barrera estructural que usa el hospedero para evitar la infección. La mayoría de los factores necróticos son enzimas y su principal función consiste en degradar el tejido. Los hongos secretan varias enzimas hidrolíticas, así como proteinasas, lipasas y fosfolipasas en el medio de cultivo, estas enzimas pueden estar involucradas en la patogenia de la infección. Por ejemplo, las proteinasas extracelulares pueden participar en la adhesión del hongo a la superficie mucosa del hospedero, invasión de tejidos y digestión de inmunoglobulinas. En

*Coccidioides immitis* se encontró que la proteinasa Ag11 fue capaz de digerir colágena humana, elastina, hemoglobina e IgG. *Aspergillus fumigatus* secreta dos proteinasas activas sobre elastina: serina proteinasa y una metaloproteinasa. *S. schenckii* también produce las proteinasas extracelulares I y II, las cuales pueden contribuir a la diseminación de la infección. (Jo-Anne, et al., 2001); (De Araujo, et al., 2001).

### **5)Componentes de pared celular.**

La melanina es una clase de pigmento cargado negativamente, típicamente de color café o negro que se forma por la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos o indólicos. Los datos sugieren que la melanina juega un papel importante en la patogénesis de ciertos hongos que infectan al humano como *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Exophiala dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* y *paracoccidioides brasiliensis*. En *Sporothrix schenckii* también se ha demostrado que el pigmento de los conidios parece protegerlos del daño oxidativo y del ataque de los macrófagos. En el caso de *Cryptococcus neoformans* se ha observado que la melanización disminuye su susceptibilidad a anfotericina B. (Morris, et al., 2003).

El dimorfismo de algunos hongos patógenos está relacionado con los componentes de la pared celular. En *P. brasiliensis* esta característica parece estar estrechamente relacionada a la síntesis de glucana, en su fase de micelio predomina el polisacárido  $\beta$ -(1,3)-glucana y en su fase de levadura el  $\alpha$ -(1,3)-glucana, esta última también se encuentra en *H. capsulatum* y *B. dermatitidis*, confiriendo resistencia a la fagocitosis debido a la alta rigidez de la pared celular (Kurokawa, et al., 1998).

### **6)Dimorfismo.**

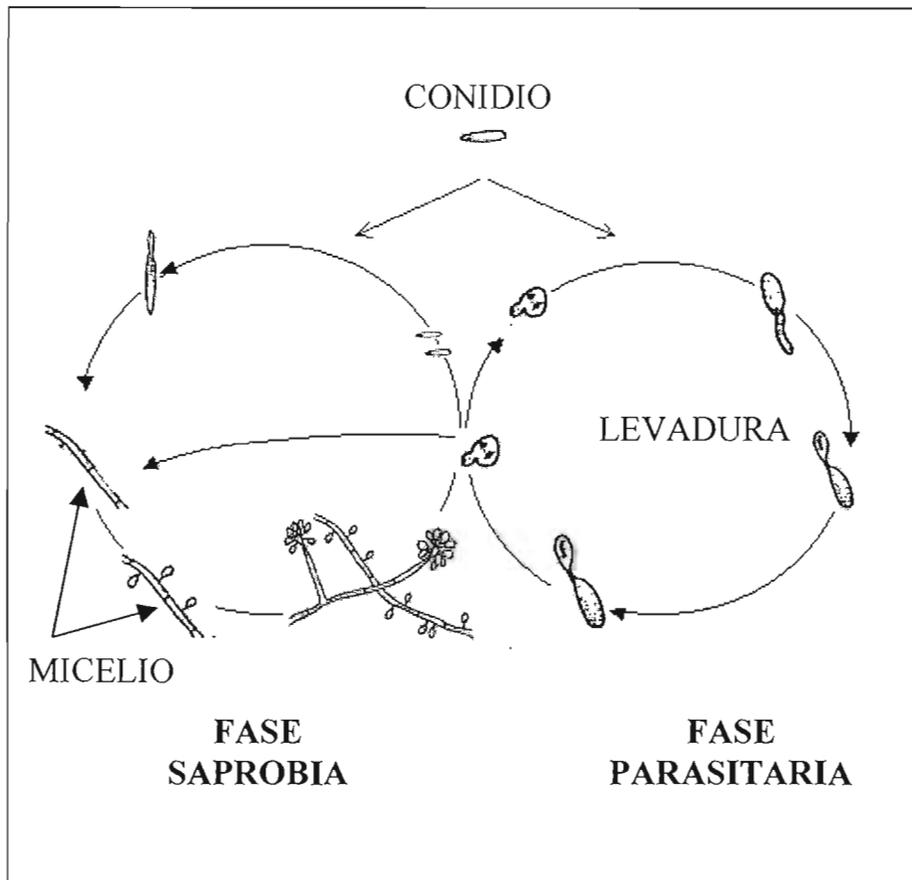
El proceso dimórfico en hongos se caracteriza por el cambio reversible entre dos morfologías: micelio y levadura, en respuesta a cambios en el medio.

El dimorfismo es un factor de virulencia que favorece el establecimiento del hongo, en la naturaleza la fase micelial induce la producción de conidios, estas propágulas son formas infectantes que se encuentran en *P. brasiliensis*, *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *C. immitis* y *S. schenckii*. Una vez establecido el hongo en el hospedero se lleva a cabo la transición a la fase parasitaria de levadura.

La forma de vida libre infectante de *S. schenckii* es el micelio, constituido por hifas y conidios. Al contacto con el medio adecuado ambos conidios hialinos y pigmentados germinan para formar uno o más tubos germinales que subsecuentemente se elongan para llegar a ser una hifa. Las levaduras se originan por gemación en los ápices o en las ramas laterales de las hifas. Las levaduras usualmente se originan de hifas a 37°C y altas tensiones de CO<sub>2</sub> pero existen evidencias de su formación directa a partir de conidios. La fase de transición morfológica es reversible (Fig. 3).

Los estudios del dimorfismo de *S. schenckii* se han enfocado en los factores nutricionales que inducen la fase de transición. La fase de levadura de *S.*

*schenckii* se obtiene cuando los conidios se incuban en medio con caseína o aminoácidos, glucosa, tiamina y biotina con agitación mecánica a una temperatura a 37°C favorece la transición de micelio a levadura. Esta fase también se desarrolla en un medio conteniendo sulfato de amonio, asparagina o arginina como fuente de nitrógeno. Considerando los aspectos relacionados al dimorfismo, varios factores inducen el cambio morfogénético como son temperatura, pH, factores nutricionales y la interacción hongo-hospedero (Kurokawa, et al., 1998).



**Fig. 3 Ciclo Biológico de *Sporothrix schenckii* in vitro.** En este se muestra su proceso dimórfico, el cual es principalmente dependiente de pH, temperatura y factores nutricionales.

### 3. INMUNOLOGÍA Y PATOLOGÍA DE LA ESPOROTRICOSIS.

La infección experimental con *Sporothrix schenckii* en ratones demostró que se requiere de las células CD4<sup>+</sup> y macrófagos para la expresión de la inmunidad celular protectora contra este hongo. Se observó que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> después de la exposición a *S. schenckii* produjeron IFN- $\gamma$ , una citosina activadora de macrófagos, y se indujo la expresión de TNF- $\alpha$ . Por tanto la

inhibición del crecimiento del hongo se observó solo cuando se combinó la respuesta de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> con los macrófagos, destacando la importancia de los macrófagos durante la infección con *S. schenckii*. En este estudio se mostró que el suero inmune no incrementa la resistencia contra este hongo, confirmando la importancia de la inmunidad celular en la defensa del hospedero contra varios hongos incluyendo *C. neoformans*, *C. immitis*, *P. brasiliensis*, *H. capsulatum*, *B. dermatitis*, *C. albicans* y *S. schenckii* (Tachibana, et al., 1999).

La respuesta inflamatoria a *S. schenckii* en lesiones primarias o secundarias es principalmente piogranulomatosa, exhibiendo pequeñas colecciones de neutrófilos con grandes áreas rodeadas de células epiteliales, linfocitos y células gigantes multinucleadas. Las lesiones en la piel muestran hiperplasia epiteliomatosa con ulceración del epitelio. El cuerpo asteroide esporotricósico ha sido estudiado y definido como una estructura levaduriforme rodeado de un halo eosinofílico. Este halo probablemente es producto de la desintegración de las células del hospedero y es considerado como una reacción antígeno-anticuerpo; tal vez representa una expresión de resistencia inmunológica en el hospedero (Ruíz, et al., 1996).

La pared celular de conidios y levaduras de *S. schenckii* tiene como componentes polisacáridos mayoritarios glucanas y mananas y posee un azúcar poco común en los hongos: ramnosa que le confiere características inmunológicas particulares. Levaduras y conidios presentan monoramnosil ramnomanas, mientras que las hifas contienen diramnosil ramnomanas (Travassos, et al., 1978).

Los anticuerpos dirigidos contra *S. schenckii* en conejos o humanos infectados parecen ser reactivos principalmente contra mananas. La gran cápsula vista en microscopía electrónica de tejidos humanos infectados con el hongo sugiere que el organismo puede producir abundante antígeno extracelular, probablemente polisacáridos. Péptido ramnomanana es el mayor componente de la pared celular externa de *S. schenckii* que provoca reacciones de hipersensibilidad retardada en la piel de pacientes y en poblaciones que potencialmente están expuestas al hongo (Rippon, 1990).

#### **4. FAGOCITOSIS.**

Las células han evolucionado una serie de estrategias para internalizar partículas y solutos, incluyendo el proceso de pinocitosis, endocitosis mediada por receptores y la fagocitosis. La pinocitosis usualmente se refiere a la toma de fluidos y solutos y está estrechamente relacionada a la endocitosis mediada por receptor, proceso específico a través del cual macromoléculas, virus y partículas pequeñas entran a las células. La pinocitosis y endocitosis mediada por receptores utilizan un mecanismo basado en clatrina y ocurren de manera independiente de la polimerización de la actina. En contraste la fagocitosis se define como el engullimiento celular de partículas grandes, mayores a 5 µm de diámetro y sucede por un mecanismo dependiente de actina.

La fagocitosis tiene una importancia fundamental para una amplia diversidad de organismos; en organismos procariontes se utiliza para la adquisición de nutrientes, mientras que en organismos eucariontes ocurre fundamentalmente en células fagocíticas. Este proceso es crítico para la degradación de agentes infecciosos y células senescentes (Aderem, et al., 1999).

El primer paso en la respuesta inmune innata del hospedero durante una infección, es el reconocimiento y la ingestión del patógeno por fagocitos profesionales como macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. El proceso de fagocitosis involucra diferentes etapas secuenciales que incluyen quimiotaxis, adhesión, endocitosis, cambios físicos y bioquímicos intracelulares como el incremento en el metabolismo general de las células, la formación del fagosoma cuya maduración permite la formación del fagolisosoma. En este último tiene lugar la formación de metabolitos reactivos de oxígeno y de nitrógeno y la acidificación del pH con la consecuente activación de enzimas hidrolíticas que degradan microorganismos o partículas.

La fagocitosis es extremadamente compleja, esta complejidad se debe en parte a la diversidad de receptores capaces de estimular la fagocitosis y en parte a la capacidad de una variedad de microbios para influenciar su destino cuando son internalizados. Para discriminar entre el agente infeccioso, los macrófagos han evolucionado un número restringido de receptores asociados a distintas vías de señalización. Janeway propuso denominar a los receptores PRRs (pattern recognition receptors) y a los blancos para estos receptores PAMPs (pathogen associated molecular patterns). Los motivos asociados a patógenos incluyen mananas en la pared celular de los hongos, péptidos formilados en bacterias, lipopolisacáridos y ácidos lipoteicoicos sobre la superficie de bacterias Gram negativas y Gram positivas. Los mecanismos de reconocimiento que conducen a la fagocitosis son celulares o humorales.

Los receptores celulares que reconocen estos patrones son MR y DEC 205 que reconocen mananas, integrinas como CD11b/CD18 y receptores scavenger que reconocen componentes de la superficie de bacterias incluyendo lipopolisacáridos (LPS).

Los componentes humorales que opsonizan el agente infeccioso antes de ser reconocido por un receptor fagocítico incluyen a la proteína de unión a manosa, la cual une mananas y es reconocida por el receptor C1q, la proteína surfactante A que une carbohidratos y es reconocida por el receptor transmembrana SPR210 (Aderem, et al., 1999).

Los anticuerpos reconocen su ligando sobre el agente infeccioso con elevada especificidad y son unidos por la familia de receptores FcRs (FcRI, FcRII y FcRIII) presentes en la membrana de la célula fagocítica. El complejo partícula-Fc es rápidamente internalizado, y liberado en lisosomas para su degradación (Montgomery, et al., 1994). Las proteínas del complemento presentes en el suero opsonizan a los microorganismos que posteriormente son fagocitados; participan los receptores CRI, CR3 y CR4 expresados en la membrana de los macrófagos. Alternativamente, el complemento es fijado a IgM que reconoce específicamente epítopes sobre la superficie del patógeno (Aderem, et al., 1999).

Todos estos receptores inducen rearrreglos en el citoesqueleto de actina, proceso finamente regulado que conduce a la internalización de la partícula,

así una variedad de señales pueden converger para reorganizar localmente el citoesqueleto de actina en un fagosoma. Sin embargo, existen diferencias importantes en los mecanismos moleculares de fagocitosis por distintos receptores, estos incluyen diferencias en los elementos del citoesqueleto que median la ingestión, diferencias en la maduración de la vacuola y en las respuestas inflamatorias, por ejemplo, la fagocitosis inducida por FcR está acoplada a la producción de moléculas proinflamatorias e intermediarios reactivos de oxígeno, en contraste CR no evoca la liberación de estos mediadores inflamatorios (Aderem, et al., 1999).

Se ha observado también que la capacidad fagocítica está limitada por la cantidad de membrana disponible, más que por la disponibilidad de receptores. Esta internalización se caracteriza por una gran extensión de la membrana celular alrededor de la partícula, un proceso dependiente de actina, seguida por la producción de superóxido y la liberación de citocinas inflamatorias del fagocito (May, et al., 2001).

En las interacciones de los hongos con fagocitos, se sabe que las células dendríticas pueden diferenciar entre las distintas fases morfológicas de los hongos dimórficos respondiendo de forma distinta. En *Candida albicans* inician una respuesta TH2 a la fase de hifa y una respuesta TH1 hacia la fase levaduriforme. Las células dendríticas infectadas con *Aspergillus fumigatus* polarizan la respuesta a TH1 y TH2 en respuesta a conidios e hifas, respectivamente. Los macrófagos residentes de tejidos, al encontrarse en una proporción más alta que las células dendríticas tienen más probabilidad de encontrar un microorganismo en la infección inicial. Aunque estos poseen la capacidad para la presentación de antígeno su principal contribución consiste en la inhibición y destrucción de los patógenos. Trabajos recientes se han enfocado en el papel de las citocinas sobre la capacidad fungicida de los macrófagos; la interacción de *Candida albicans* y monocitos humanos seguida del tratamiento con M-CSF aumenta la producción de anión superóxido y la fagocitosis, observando el mismo efecto con IL-13. En un estudio con ratones a los que les falta la capacidad para producir citocinas TH1 y TH2 incluyendo IL-6 e IL-12 manifiestan una susceptibilidad más severa a *Cryptococcus neoformans* y la IL-10 considerada una citocina inmunosupresora de TH1 confiere mayor resistencia a la criptococosis (Mansour, et al., 2002).

## HIPÓTESIS

Si en la naturaleza el conidio es la forma infectante y en pacientes se encuentran levaduras intracelulares en macrófagos, el conidio debe tener elementos que le permiten evadir la destrucción por los fagocitos.

## OBJETIVOS

### **Objetivo General:**

A) Caracterizar el proceso de fagocitosis de conidios hialinos de *Sporothrix schenckii* en la línea celular U-937.

B) Estudio del cambio morfogénico de conidios de *S. schenckii* fagocitados por la línea celular de macrófagos U-937.

### **Objetivos particulares:**

Determinar las condiciones óptimas para la fagocitosis de conidios en macrófagos U-937.

Determinar si la transición dimórfica del hongo se lleva a cabo intracelularmente en macrófagos U-937.

## ANTECEDENTES

Desde el reporte original de Shenck en 1898 cientos de casos humanos de esporotricosis habían sido reportados, sin embargo, poco se conoce acerca de la interacción entre el agente etiológico y el hospedero humano. En los intentos por explicar los mecanismos de defensa del hospedero contra *Sporothrix schenckii* Cunningham evaluó la fagocitosis de levaduras por neutrófilos humanos durante 60 minutos y observó el 50% de fagocitosis con un 80% de la muerte del hongo fagocitado. Los resultados sugieren que los neutrófilos participan en la resistencia a la diseminación de la esporotricosis (Cunningham, et al., 1979).

En un modelo murino infectado por *S. schenckii* se encontró que los neutrófilos participan en la fagocitosis durante la infección temprana, observando que estos migran hacia las levaduras pero fueron incapaces de destruir al hongo. En reportes previos de pacientes con esporotricosis los neutrófilos presentan la misma incapacidad para destruir a las levaduras de *S. schenckii*. Debido a la proliferación intracelular de este hongo se sugiere que este utiliza a los macrófagos como un mecanismo de escape estableciéndose así la infección crónica (Peng-Cheng, et al., 1993).

Respecto a la caracterización de los receptores involucrados en la fagocitosis de levaduras de *S. schenckii* por macrófagos murinos peritoneales se encontró que la fagocitosis de levaduras no opsonizadas aparentemente depende de la reactividad de los componentes de la superficie celular del hongo con los receptores apropiados en la membrana celular del macrófago. La opsonización de levaduras con concanavalina A aumentó la fagocitosis, el tratamiento de las levaduras con neuraminidasa incremento la ingestión 7.7 veces, azúcares presentes en la superficie celular de la pared del hongo como ramnosa, además la presencia en el medio de manosa y galactosa inhibieron parcialmente la fagocitosis (40-50%). Los resultados indican la existencia de múltiples receptores de carbohidratos sobre la membrana del macrófago, los cuales reconocen específicamente componentes de la superficie celular de *S. schenckii* (Oda, et al., 1983).

La fagocitosis de conidios pigmentados y mutantes albinas de *S. schenckii* en monocitos humanos de sangre periférica mostró que los conidios pigmentados resisten más la fagocitosis que los mutantes albinos, el número de conidios fagocitados fue de 1-2 y de 4-7, los índices fagocíticos encontrados fueron  $154 \pm 20$  y  $644 \pm 20$ , respectivamente. El índice fagocítico (I) se obtuvo determinando el % de células fagocíticas (P) multiplicado por el número promedio de conidios fagocitados (F). Los resultados muestran que la melanina presente en la pared celular de *S. schenckii* es un componente importante que protege a las células de la fagocitosis. (Romero, et al, 2000). También se reporta la influencia de los componentes de la pared celular en la fagocitosis de los conidios de *S. schenckii* la cual está influenciada por la composición de la pared celular que varía con la edad del cultivo. Los conidios de 4 y 7 días, tienen un alto contenido en ramnosa y bajo en manosa, en tanto que en los

conidios de 12 días se invierte esta relación. La virulencia de los conidios correlaciona con la capacidad de los macrófagos murinos para ingerir conidios, obteniendo un índice fagocítico significativamente mayor para los conidios de 12 días:  $45 \pm 5$  y de  $16 \pm 3$  para conidios de 7 días (Fernández, et al, 2000).

El estudio histopatológico de lesiones de pacientes con esporotricosis mostraron que las células del hongo fueron fagocitadas por neutrófilos en un 18%, por macrófagos en un 26% y por células gigantes en un 42%. La relevancia del estudio es la existencia de estructuras miceliales de longitud corta que demuestran la existencia de una transición *in vivo* de la fase micelial a la fase de levadura observándose una alta viabilidad y gemación de la levadura (Hiruma, et al., 1992).

En los estudios histológicos realizados en pacientes con esporotricosis generalmente se encuentran levaduras en interacción con diferentes células que tienen capacidad fagocítica. Recientemente, Castro reportó que las células endoteliales pueden actuar como un reservorio para las levaduras de *S. schenckii* durante la infección. Las levaduras de *S. schenckii* fueron capaces de adherirse a células endoteliales de vena umbilical de humano (HUVEC), localizándose dentro de vacuolas endocíticas sin causar algún daño detectable a las células en 24 h de infección. Esta es la primera demostración que *S. schenckii* es capaz de adherirse e invadir las células endoteliales sin afectar la integridad celular. En este modelo se observó también que la expresión de algunas moléculas de adhesión está modulada por mediadores inflamatorios; el tratamiento de células HUVEC con IL-1 $\beta$  y TGF- $\beta$  antes de la infección incrementó significativamente la asociación de las levaduras a las células endoteliales (Castro, et al., 2004).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La esporotricosis es la micosis subcutánea más frecuente en México (Ruíz, et al., 1996) producida por el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*.

Aunque los mecanismos de defensa contra *S. schenckii* no están completamente comprendidos se sabe que en las etapas tempranas de la infección los macrófagos tienen un papel esencial como primera barrera de defensa y como activadores de células T (Tachibana, et al., 1999). En el macrófago las condiciones son complejas y hostiles para los patógenos intracelulares, por lo que muchos de estos microorganismos han desarrollado estrategias para sobreponerse a la agresividad del ambiente interno y sobrevivir.

Los distintos hallazgos de estudios histopatológicos en humanos donde se evidencian formas levaduriformes viables de *S. schenckii* presentes en los macrófagos (Hiruma, et al., 1992) sugiere que la fase infectiva de este hongo (hifas y conidios) tiene la capacidad en ocasiones de evadir el proceso de fagocitosis permitiendo su transición dimórfica a la fase parasitaria de levadura y la diseminación de la infección.

La mayoría de los estudios de fagocitosis con *S. schenckii* se han realizado con la fase levaduriforme la cual únicamente se desarrolla en el hospedero. Es muy poco lo que se conoce de la interacción de la fase saprobia (hifas y conidios) que es la infectante. Por lo que en este trabajo iniciamos la caracterización de la fagocitosis por macrófagos U-937 de conidios de *S. schenckii*.

# METODOLOGÍA

## **1. Mantenimiento de la línea celular U-937.**

La línea celular U-937 de monocitos humanos se mantuvo en suspensión en medio RPMI (Gibco 23400-021) suplementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco 12318-028), con una mezcla de penicilina 100 U/ml/estreptomicina 100 µg/ml a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Para propagar los monocitos, estos se centrifugaron a 700 rpm durante 7 minutos y se resuspendieron en 1 ml, se contaron en una cámara de Neubauer, monitoreando la viabilidad con azul tripano (Sigma T0776), al final la pastilla celular se resuspendió en una densidad de 1X10<sup>6</sup> células/ml de medio RPMI suplementado con suero.

### **1.1 Diferenciación de monocitos U-937.**

Los monocitos se diferenciaron a macrófagos con PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma P8139) 10 nM incubando a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 48 h. Los monocitos se depositaron en placas de cultivo de 24 pozos con cubreobjetos de 12 mm de diámetro a una densidad de 2X10<sup>5</sup> monocitos/pozo. La viabilidad de los macrófagos postdiferenciación se monitoreó con azul tripano (Sigma T0776).

### **1.2 Congelamiento y descongelamiento de monocitos U-937.**

Los monocitos se centrifugaron a 700 rpm durante 7 minutos, se resuspendieron, se contaron en la cámara de Neubauer con azul tripano y se colocaron en criotubos 5X10<sup>6</sup> monocitos en suero fetal bovino (Gibco 12318-028) y 5% de dimetilsulfóxido (DMSO Sigma D2650). El congelamiento fue gradual 12 h a -20°C, toda la noche a -70°C y al día siguiente se colocaron en un tanque de nitrógeno líquido hasta su uso.

El descongelamiento fue rápido, para eliminar residuos de DMSO se depositó el contenido del criotubo en un tubo con 25 ml de RPMI, se centrifugó a 1000 rpm durante 3 min y se observó la viabilidad, se resuspendió en 1X10<sup>6</sup> células/ml de RPMI suplementado y se incubó a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

## **2. Condiciones de crecimiento de conidios de *S. schenckii*.**

En este trabajo se utilizó una cepa de origen clínico (EH-257) y se sembró en tubos con medio mínimo para conidios hialinos incubándose a 28°C durante 7 días. Para obtener los conidios se adicionó agua destilada estéril a los tubos, se agitaron y posteriormente se filtro en papel Wathman. La suspensión se centrifugó a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 min, se resuspendió el paquete celular en PBS estéril y se contaron los conidios en la cámara de Neubauer.

## **3. Preparación de antígenos de *S. schenckii*.**

Se obtuvo una suspensión de conidios, la cual se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min. El paquete celular se incubó con formaldehído durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y al paquete celular se le adicionó acetona para eliminar residuos de formaldehído. Una vez

que se seco la muestra se resuspendió en PBS a una concentración de 1 mg/ml y se le adicionó azida de sodio para evitar contaminaciones. La suspensión de conidios se almacenó a 4°C hasta su uso.

### **3.1 Producción de anticuerpos contra *S. schenckii*.**

Se produjeron anticuerpos (Abs) policlonales anti-*Sporothrix schenckii* para conidios hialinos y pigmentados en conejos Nueva Zelanda de 3 meses de edad. Los conejos fueron inmunizados semanalmente en la vena marginal de la oreja con 1 mg/ml de la suspensión de conidios. Durante el esquema de inmunización se monitoreó el título de Abs por ELISA. Una vez que se alcanzó la máxima concentración de Abs se realizó la sangría por punción cardiaca. Se centrifugó la sangre a 3000 rpm durante 30 min, se descartó el paquete celular y se recuperó el suero anti-*Sporothrix schenckii*. Este fue utilizado para purificar las IgGs por una columna de proteína recombinante de agarosa G (Gibco rProtein G Agarose 15920-010). La pureza e integridad de los Abs se verificó en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes, el gel se tiñó con azul coomasie. Se cuantificó la concentración de proteína del suero total por el método de Lowry.

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

Los conidios se incubaron con suero completo, suero descomplementado anti-*Sporothrix schenckii* e IgG purificada anti-*Sporothrix schenckii*, en PBS durante 30 min a 28°C. La suspensión de conidios se agitó a intervalos de 10 min. Para eliminar el exceso de opsoninas se realizaron 3 lavados con PBS centrifugando cada vez a 3500 rpm durante 5 min.

### **4.1 Obtención de índices fagocíticos por fluorescencia en macrófagos U-937.**

Los conidios opsonizados o sin opsonizar se incubaron con isotiocianato de fluoresceína (FITC Isomero I, Sigma F1628) a una concentración final de 10 µg/ml en amortiguador de carbonatos pH 9.4 por 30 min a temperatura ambiente, en la oscuridad. Se realizaron 3 lavados con el mismo amortiguador para eliminar el FITC no unido a los conidios (Ibrahim, et al., 2003), (Groope, et al., 1993), (Strasser, et al., 1999). Los ensayos se realizaron en placas de cultivo de 24 pozos, los macrófagos se infectaron con los conidios marcados con FITC a una multiplicidad de infección (MOI) de 40 conidios/macrófago con 300 µl de medio RPMI/pozo, se centrifugó la placa a 1000 rpm durante 1 min y se incubó a 4°C durante 30 min para permitir la adhesión de los conidios a los receptores de la superficie del macrófago. Se lavó suavemente la monocapa para desechar los conidios no unidos, se adicionaron nuevamente 300 µl de medio RPMI/pozo y se incubó la placa durante 30 y 60 min a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% para la fagocitosis de los conidios.

Posterior al tiempo de fagocitosis se incubó con azul tripano al 0.5% durante 5 min, con la finalidad de eliminar la fluorescencia de los conidios no fagocitados (Noah, et al., 1998), (Levitz, et al., 1999). Se lavó la monocapa con PBS frío, se fijó con metanol absoluto y se procedió a montar los cubreobjetos con vectashield (VECTOR H-1000). El índice fagocítico se obtuvo contando 200

macrófagos de distintos campos al azar, incluyendo macrófagos con y sin conidios, en un microscopio de fluorescencia con un aumento de 100X. El índice fagocítico (I) representa el número de macrófagos que han fagocitado al menos 1 conidio entre el número total de macrófagos contados.

#### **4.2 Viabilidad de los macrófagos.**

Durante todo el trabajo experimental se monitoreó la viabilidad de los macrófagos postinfección con el colorante de exclusión azul tripano (Sigma T0776).

#### **5. Análisis estadístico.**

Los índices fagocíticos fueron reportados como promedio y desviación estándar. La t de Student se usó para comparar diferencias significativas entre muestras. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró como significativo.

#### **6. Transición dimórfica de *S. schenckii* en macrófagos U-937.**

En placas de cultivo de 24 pozos con cubreobjetos de 12 mm de diámetro se infectaron los macrófagos con conidios hialinos en una multiplicidad de infección de 1 conidio/macrófago. Se infectó con conidios no opsonizados muertos y vivos y con conidios opsonizados con suero anti-*Sporothrix schenckii* completo y descomplementado e IgG anti-*Sporothrix schenckii* purificada. Se permitió la fagocitosis a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 24, 48 y 72 h. Posterior al tiempo de incubación se fijó la monocapa con metanol absoluto y se tiñó con Giemsa durante 30 min diluido 1:15 ( Gibco Karyomax Giemsa Stain 10092-013). Se lavaron los cubreobjetos con PBS y se montaron con gliceraldehído al 40% en PBS.

#### **6.1 Dimorfismo de *S. schenckii* en macrófagos U-937 en presencia de NH<sub>4</sub>Cl.**

En placas de cultivo de 24 pozos con cubreobjetos de 12 mm de diámetro se infectaron los macrófagos con conidios hialinos en una multiplicidad de infección de 1 conidio/macrófago. Se infectó con conidios no opsonizados muertos y vivos y con conidios opsonizados con suero completo y descomplementado anti-*Sporothrix schenckii* e IgGs purificadas anti-*Sporothrix schenckii*. Se incubaron las monocapas con RPMI/Suero fetal bovino 10% y NH<sub>4</sub>Cl 25 mM pH 7.4 permitiendo la fagocitosis a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 24, 48 y 72 h. Cada 24 h se cambio el medio RPMI con suero y NH<sub>4</sub>Cl. Posterior al tiempo de incubación se fijó la monocapa con metanol absoluto y se tiñó con giemsa durante 30 min diluido 1:15 ( Gibco Karyomax Giemsa Stain 10092-013). Se lavaron los cubreobjetos con PBS y se montaron con gliceraldehído al 40% en PBS.

## **6. 2 Inmunofluorescencia.**

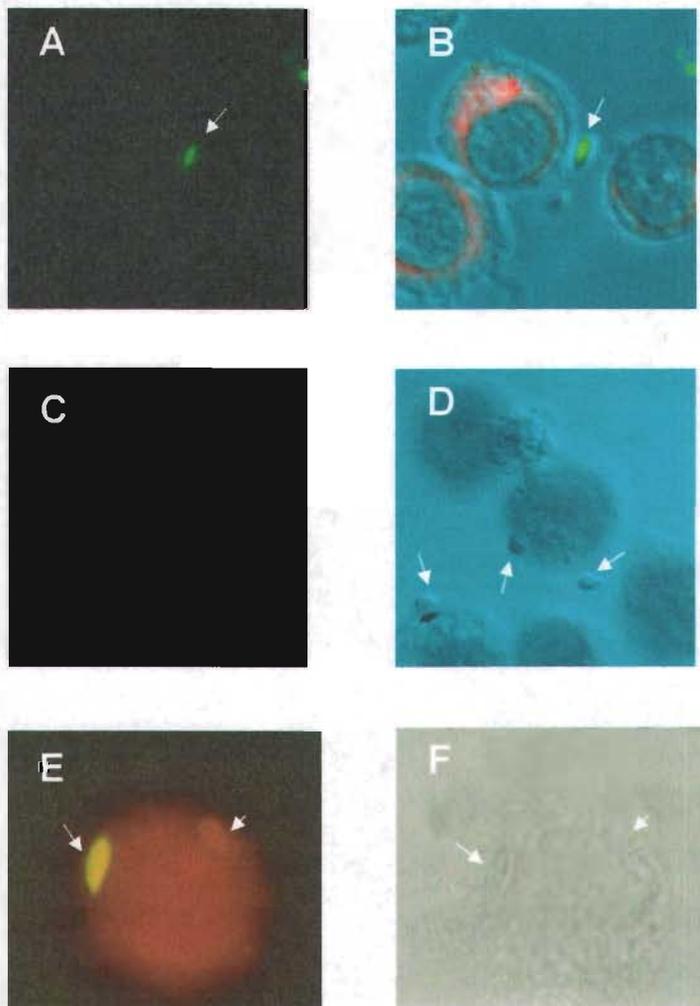
Posterior al tiempo de transición dimórfica se lavaron las laminillas con PBS frío. La monocapa se incubó con 30  $\mu$ l de anticuerpo primario IgG de conejo anti-*Sporothrix schenckii* diluido 1:5000 en PBS y BSA 0.1% durante 1:30 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados rápidos con PBS, y 3 más incubando 5 min sobre hielo. Se incubó con 30  $\mu$ l de anticuerpo secundario anti conejo IgG-FITC (Sigma F0382) en una dilución 1:200 en PBS y BSA 0.1% durante 1:30 h a temperatura ambiente. Se procedió a realizar los mismos lavados. Por último se realizó el montaje de las laminillas con Vectashield (Vector H-1000) y estas se analizaron en un aumento de 100X en un microscopio de fluorescencia.

## RESULTADOS. CAPITULO I

### FAGOCITOSIS.

### 1. Estandarización de la cuantificación fagocítica por fluorescencia.

En los ensayos de cuantificación de fagocitosis es esencial discriminar entre las partículas ingeridas y las adheridas a la membrana del macrófago. Debido a esto en el laboratorio se estandarizó un método de fluorescencia, en este método los conidios marcados con FITC interaccionan con los macrófagos a 37°C permitiendo la fagocitosis, posteriormente, se lava la monocapa y se incubaba con azul tripano. El azul tripano se utiliza como un agente para blanquear la fluorescencia y al ser un colorante de exclusión para las células viables tiene la capacidad de eliminar la fluorescencia exclusivamente de los conidios extracelulares hasta en un 95%.



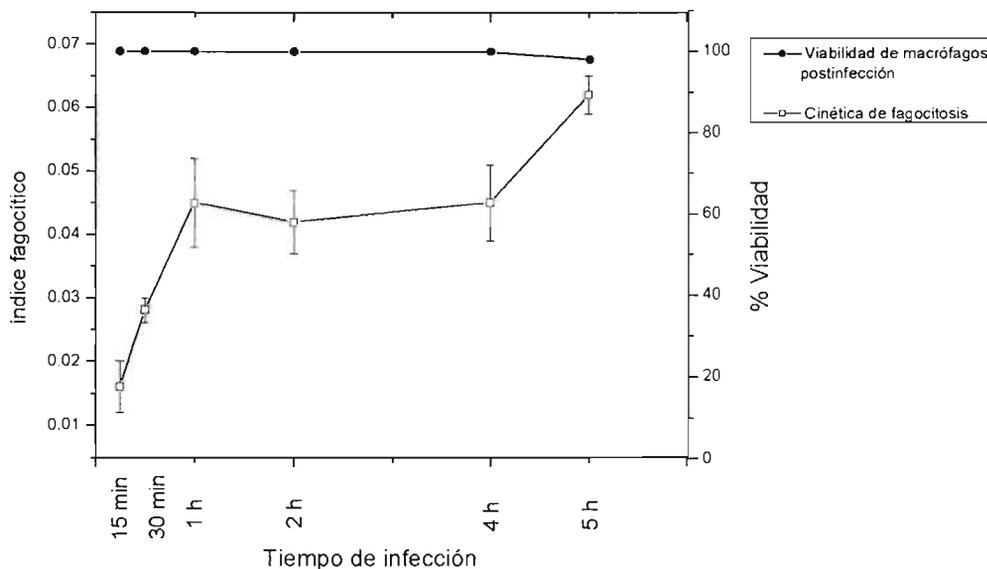
**Fig. 4 Controles correspondientes al método de fluorescencia.** Los índices fagocíticos se obtuvieron por el método de fluorescencia, A y B) Las flechas señalan los conidios marcados con 10  $\mu\text{g/ml}$  de FITC en interacción con macrófagos U-937, campo oscuro y claro, respectivamente. C y D) Control de blanqueo de fluorescencia: las flechas en D señalan los conidios marcados con 10  $\mu\text{g/ml}$  de FITC en interacción con macrófagos U-937 tratados con azul tripano al 0.5% durante 5 min, campo claro y oscuro, respectivamente. E y F) La flecha señala el conidio fagocitado marcado con FITC, La punta de flecha señala el conidio extracelular adherido a la membrana del macrófago al cual se le blanqueo la fluorescencia con el azul tripano, campo oscuro y claro, respectivamente.

Para determinar la toxicidad del fluorocromo FITC a los conidios, se realizaron pruebas de viabilidad a los conidios marcados con FITC, los cuales posterior al marcaje fueron sembrados en cajas con medio YPD a 28°C durante siete días. La viabilidad de los conidios no tratados fue del 95% y de los tratados del 80%. Este método de fluorescencia nos permitió discriminar entre los conidios fagocitados y los no fagocitados (Fig. 4).

## 2. Cinética de fagocitosis de conidios hialinos de *S. schenckii* en macrófagos U-937.

Con el método de fluorescencia se inició la caracterización del proceso de fagocitosis de los conidios.

En la figura 5 se muestra la cinética de fagocitosis de los conidios hialinos por macrófagos U-937, con la respectiva viabilidad de los macrófagos posterior a la infección.



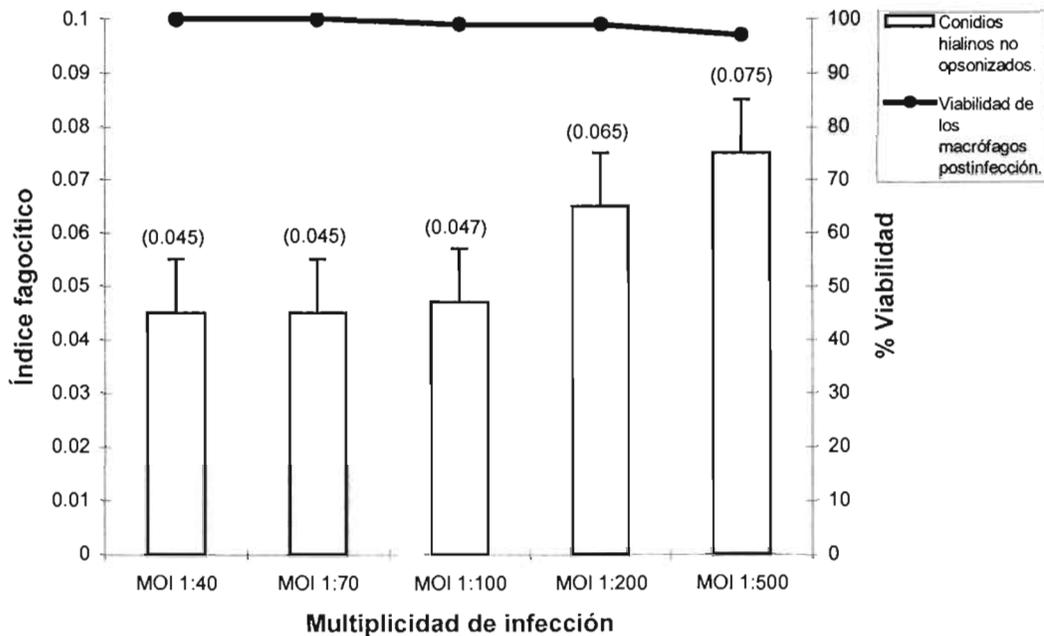
**Fig. 5 Cinética de fagocitosis de conidios no opsonizados por macrófagos U-937.** La infección se realizó en una MOI de 40 conidios/macrófago. La viabilidad de los macrófagos posterior a la infección se determinó con azul tripano. Los datos presentados son el promedio de al menos tres experimentos independientes, con su respectiva desviación estándar. Los valores entre paréntesis son el índice fagocítico (I), el cual representa la fracción de la población de macrófagos capaz de fagocitar y se obtiene del cociente del número de macrófagos que han fagocitado al menos un conidio entre 200 macrófagos contados.

Los resultados mostraron que la cinética de fagocitosis por macrófagos U-937 de conidios hialinos no opsonizados en el transcurso del tiempo fue baja, a los 15 min el 2% de los macrófagos fagocitó 1 conidio en promedio, incrementando al 6% de macrófagos a las 5 h. La fagocitosis mostró dos picos uno a los 60 min con un plato intermedio de 3 h y otro a las 5 h.

### 3. Determinación de la actividad fagocítica incrementando la multiplicidad de infección de los conidios hialinos de *S. schenckii*.

Ya que la fagocitosis de los conidios fue muy baja con una infección de 40 conidios por macrófago, se varió este parámetro para determinar si el número de conidios por macrófago era un factor determinante en el proceso de fagocitosis. Se realizó una curva variando la multiplicidad de infección de los conidios no opsonizados a un tiempo fijo de 60 min de incubación a 37°C.

En la figura 6 se observa que a una multiplicidad de infección de 1:40, 1:70 y 1:100 (macrófago:conidio) la fagocitosis no varió e incremento ligeramente al aumentar la multiplicidad de infección a 1:200 y 1:500. La viabilidad de los macrófagos permaneció constante aún a altas densidades de conidios.



**Fig. 6 Fagocitosis de conidios de *S. schenckii* no opsonizados en macrófagos U-937.** Se infectaron las monocapas con multiplicidades de infección crecientes y se incubaron a 37°C durante 1 h. La viabilidad de los macrófagos se monitoreó al final de la infección con azul tripano. Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes con su respectiva desviación estándar. Los valores entre paréntesis son el índice fagocítico (I), el cual representa la fracción de la población de macrófagos capaz de fagocitar y se obtiene del cociente del número de macrófagos que han fagocitado al menos un conidio entre 200 macrófagos contados.

Se encontró que la fagocitosis de conidios hialinos sin opsonizar es mínima aún a tiempos largos (5 h) y el aumento en la multiplicidad de infección no incrementa de forma importante la fagocitosis. A los 60 min con una infección de 500 conidios por macrófago el índice fagocítico fue 1.6 veces mayor comparándolo con la relación de 40 conidios por macrófago; el 7.5% y 4.5% de los macrófagos fagocitó un conidio en promedio, respectivamente.

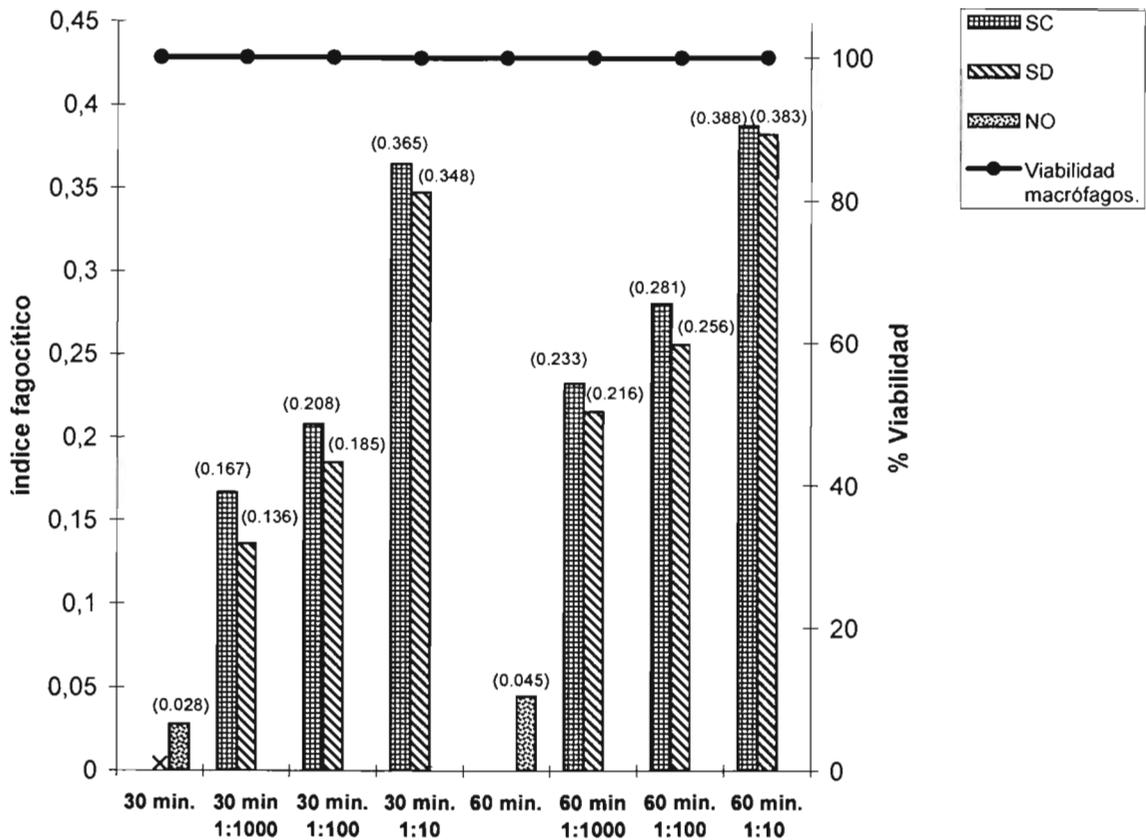
Este resultado sugiere que los antígenos del hongo son reconocidos en baja proporción por los receptores presentes en la superficie de los macrófagos U-937.

#### **4. Determinación de la participación del suero y el complemento en la fagocitosis de los conidios hialinos por macrófagos U-937.**

Ya que los conidios sin opsonizar presentan muy bajo índice fagocítico se probaron distintas opsoninas: suero completo anti-*Sporothrix schenckii* (el cual tiene una constitución muy compleja incluyendo a los factores del complemento y distintos carbohidratos) y suero descomplementado a 56°C. Los conidios opsonizados se incubaron con los macrófagos U-937 en una MOI de 40 conidios/macrófago durante 30 y 60 min.

Los resultados muestran que la opsonización de los conidios hialinos con concentraciones crecientes de suero inmune promueve una interacción celular importante con los macrófagos U-937. La máxima fagocitosis se observó con el suero diluido 1:10, el índice fagocítico aumentó 13 veces a los 30 min y 8.6 veces a los 60 min respecto a los conidios no opsonizados. En esta misma concentración de suero a los 60 min la fracción de macrófagos que fagocitó aumentó del 4.5% (conidios no opsonizados) al 38.8% (Fig. 7).

La fagocitosis de los conidios incubados con suero fue rápida a los 30 min e incrementó al aumentar la concentración de suero, mostrando una curva dosis-dependiente. No se observó una diferencia importante en la fagocitosis a los 30 y 60 min (Fig. 7).



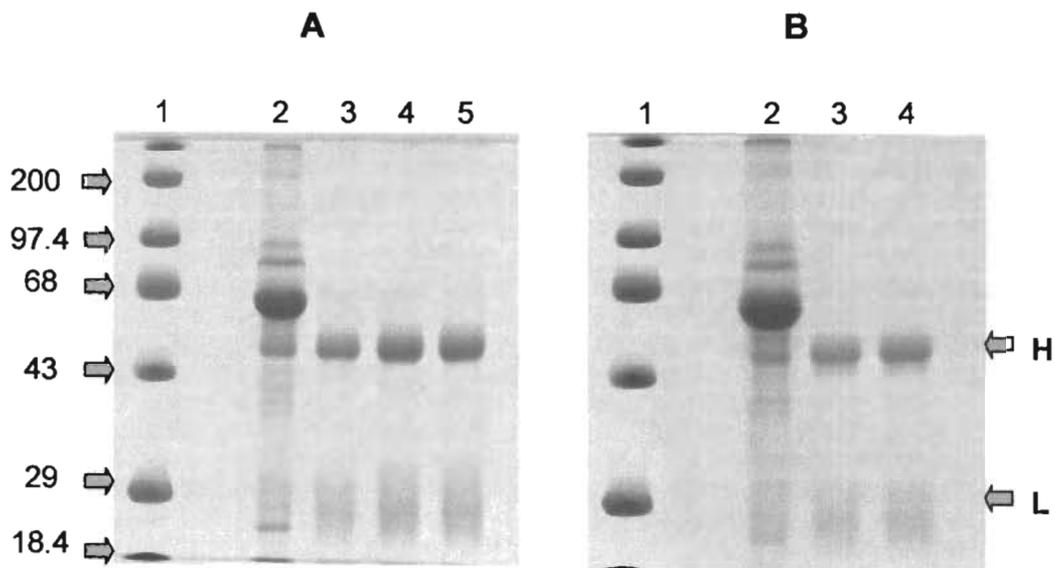
**Fig. 7 Fagocitosis de conidios opsonizados con suero anti-*S. schenckii* por macrófagos U-937.** Se infectaron las monocapas con conidios opsonizados con concentraciones crecientes de suero completo (SC), suero descomplementado (SD) y conidios no opsonizados (NO) en una MOI de 40 conidios por macrófago y se incubaron a 37°C durante 30 y 60 min. La viabilidad de los macrófagos posterior al tiempo de infección se determinó con azul tripano. Los resultados son el promedio de 10 experimentos. El índice fagocítico (I) representa la fracción de la población de macrófagos capaz de fagocitar y se obtiene del cociente del número de macrófagos que han fagocitado al menos un conidio entre 200 macrófagos contados.

Los índices fagocíticos obtenidos con el suero descomplementado no mostraron una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) con respecto al suero completo, lo que sugiere que esta opsonina no participa o participa muy poco en la unión de los conidios con los receptores de los macrófagos durante la infección temprana (Fig. 7).

Como control negativo se realizó la opsonización con suero de conejo no inmune completo y descomplementado, observándose que este suero no favorece la fagocitosis del conidio en ninguna condición.

## 5. Efecto de la opsonización con IgGs sobre la fagocitosis de conidios hialinos de *S. schenckii* en macrófagos U-937.

Para determinar la participación de las IgGs del suero inmune en la fagocitosis de este hongo se purificaron en una columna de proteína recombinante de agarosa G como se observa en la figura 7. Las IgG purificadas corresponden a los pozos 3, 4 y 5 (7A) y 3 y 4 (7B).

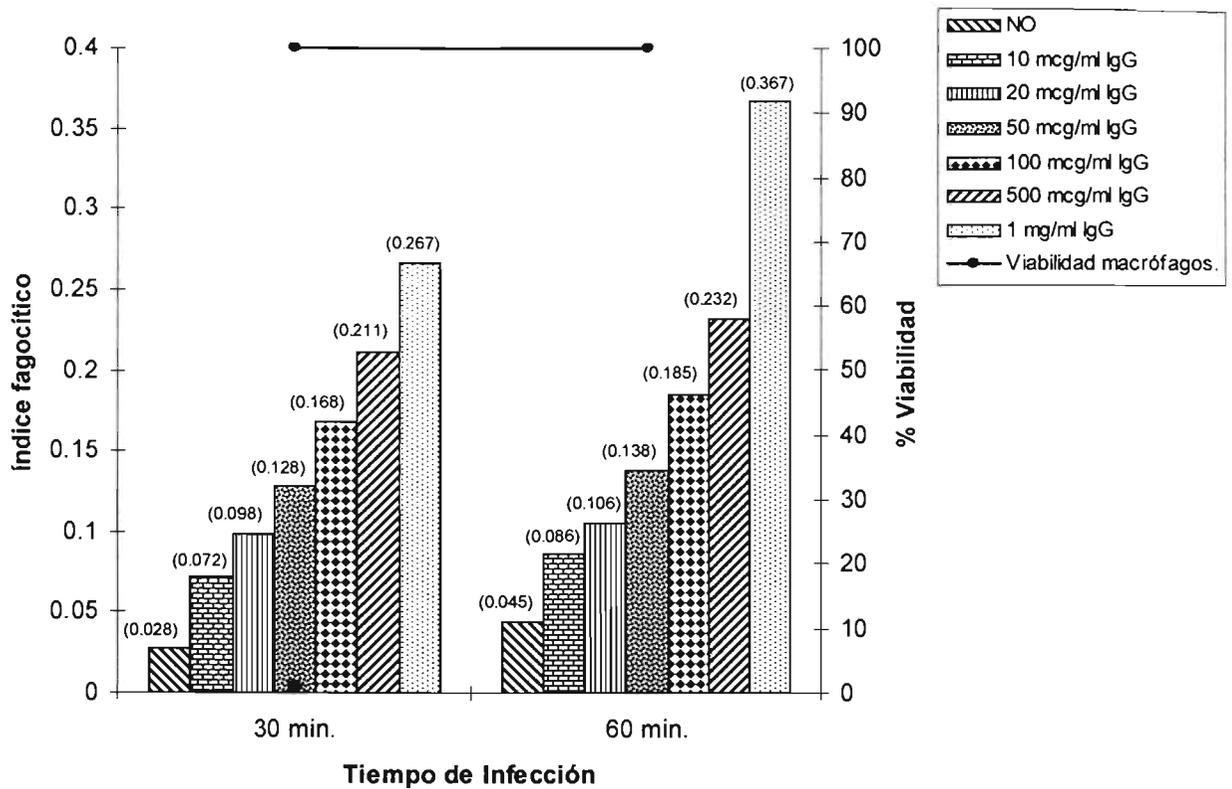


**Fig. 8 IgGs anti-*S. schenckii* purificadas por una columna de proteína G.** Electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12%. **A)** El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular en kDa, el 2 es el suero completo contra conidios hialinos y el 3-5 son diferentes muestras de IgGs purificadas. **B)** El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular en kDa, el 2 es el suero completo contra conidios pigmentados y 3-4 corresponden a las IgGs purificadas. Las flechas a la derecha señalan la cadena pesada H y la ligera L correspondientes a la IgG.

Con las fracciones de anticuerpo purificado se opsonizaron los conidios de *S. schenckii*. La opsonización con IgG anti-*Sporothrix schenckii* favoreció de forma importante la unión y fagocitosis del hongo. A los 30 min el índice fagocítico aumentó 2.5, 6 y 9.5 veces al incrementar la concentración de IgG a 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/ml}$  respecto a los conidios no tratados. A los 60 min de incubación con 1 mg/ml de IgG se encontró que el 36.7% de los macrófagos fagocitó de 1-3 conidios en promedio.

Se observó que a los 30 min de interacción se llegó a la máxima ingestión del conidio, ya que los valores a los 60 min son muy semejantes. Las concentraciones crecientes de anticuerpo al igual que en el suero inmune mostraron una curva dosis-dependiente.

No se observó saturación de los receptores a concentraciones por debajo de 1 mg/ml (Fig. 9).



**Fig. 9 Fagocitosis de *S. schenckii* por macrófagos U-937 influenciada por la opsonización con anticuerpo.** Los conidios hialinos de *S. schenckii* fueron preincubados con concentraciones crecientes de IgG anti-*S. schenckii* y posteriormente interaccionados con macrófagos U-937 durante 30 y 60 min. La viabilidad de los macrófagos posterior al tiempo de infección se determinó con azul tripano. Los datos presentados son el promedio de al menos tres experimentos independientes. El índice fagocítico (I) representa la fracción de la población de macrófagos capaz de fagocitar y se obtiene del cociente del número de macrófagos que han fagocitado al menos un conidio entre 200 macrófagos contados.

## RESULTADOS. CAPITULO II

### TRANSICIÓN DIMÓRFICA.

## 1. Transición dimórfica de conidios hialinos de *S. schenckii* en macrófagos U-937.

En estudios histológicos de muestras de pacientes con esporotricosis se observan levaduras gemantes dentro de macrófagos y neutrófilos. Estos resultados sugieren que el hongo *S. schenckii* tiene la capacidad de realizar la transición dimórfica en el interior de las células fagocíticas. Para analizar el proceso de cambio morfológico del hongo dentro de la línea celular U-937, se utilizaron conidios en tres condiciones diferentes: conidios inactivados por calor no opsonizados, conidios viables no opsonizados y conidios viables tratados con distintas opsoninas (suero inmune, suero inmune descomplementado e IgG).

En las monocapas de macrófagos U-937 infectadas con conidios viables se identificaron distintas morfologías intracelulares desde las 24 h de interacción. Esto puede explicarse a que se parte de una población de conidios no sincronizada.

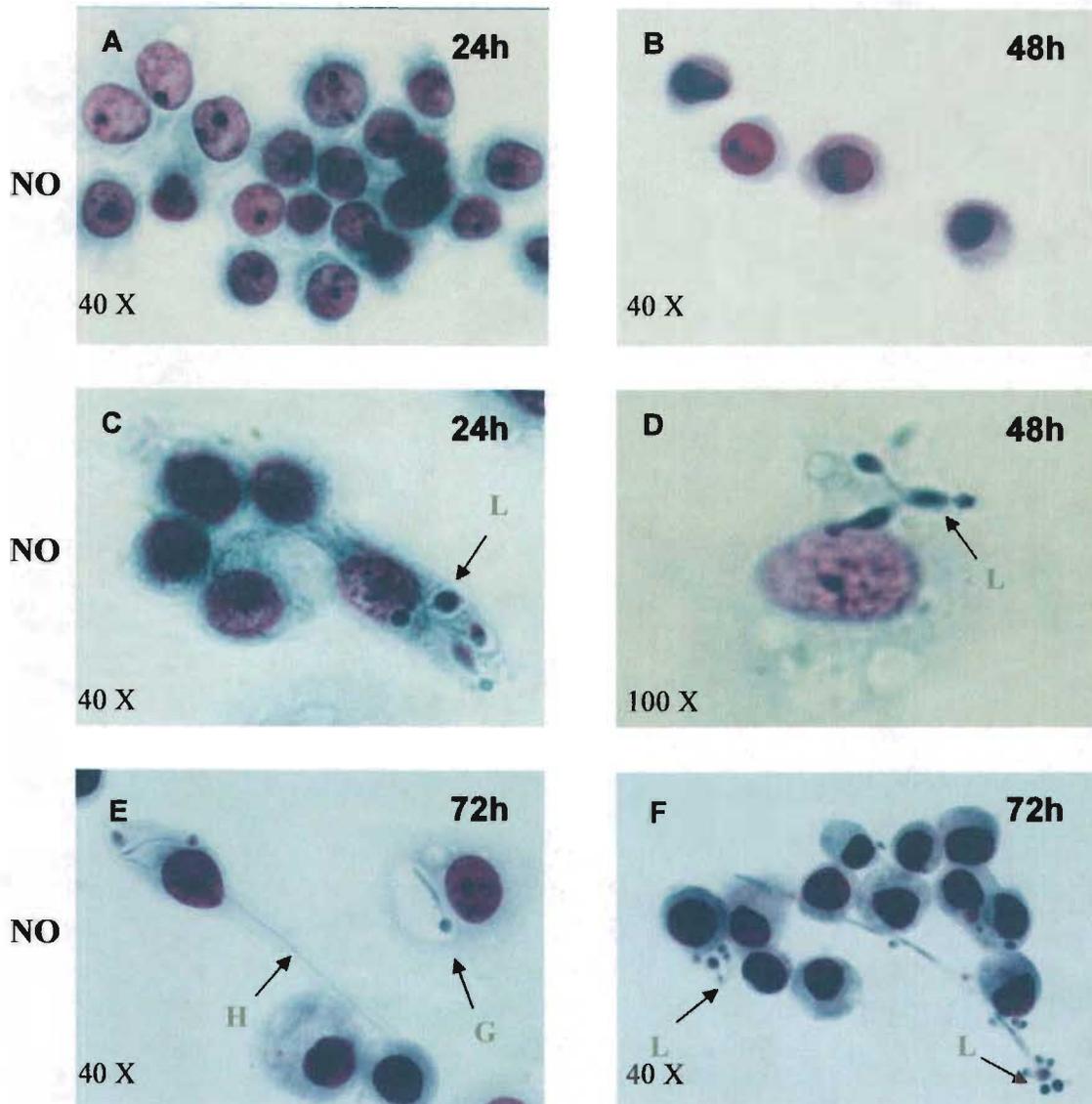
**A)** Los conidios hialinos inactivados por calor fueron destruidos completamente a las 24 h de infección (Fig. 10 A y B), no se encontraron restos de partículas fúngicas.

**B)** Los conidios vivos no opsonizados se diferenciaron a levadura desde las 24 h de interacción observándose delimitados dentro de vacuolas endocíticas (Fig. 10 C y D). A tiempos de infección de 72 h se observaron hifas largas intracelulares que deformaron la membrana del macrófago (Fig. 10 E). También se muestran hifas extracelulares originando levaduras en la parte apical, así como levaduras adheridas a la membrana del macrófago (Fig. 10 F).

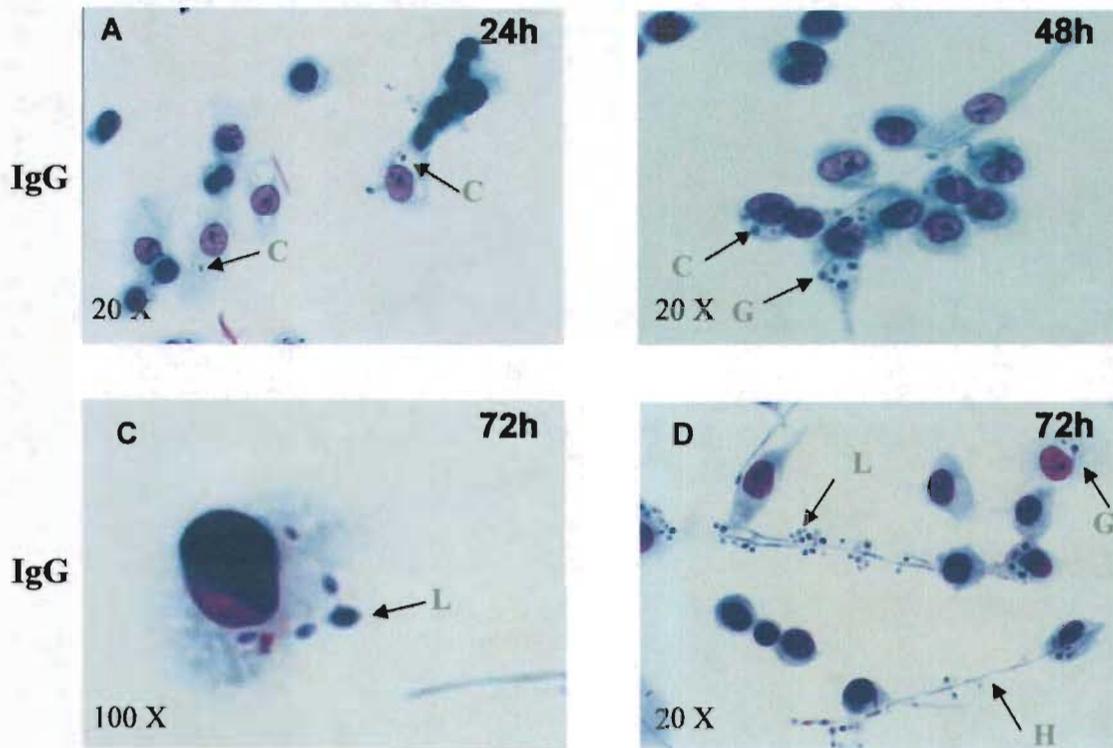
**C)** En los macrófagos infectados con conidios viables opsonizados con IgG anti-*Sporothrix schenckii* se observaron a las 24 h conidios íntegros delimitados en vacuolas endocíticas (Fig. 11 A). Se identificaron germínulas, levaduras e hifas extracelulares a las 72 h de incubación (Fig. 11 C y D).

**D)** La opsonización con suero inmune muestra conidios hinchados a las 24 y 72 h (Fig. 12 A y C) y a las 48 h se observaron germínulas y levaduras gemantes en una misma vacuola endocítica (Fig. 12 B), mientras que a las 72 h se observaron en un mismo macrófago conidios íntegros, hifas y germínulas en distintas vacuolas endocíticas (Fig. 12 D), sugiriendo múltiples procesos fagocíticos.

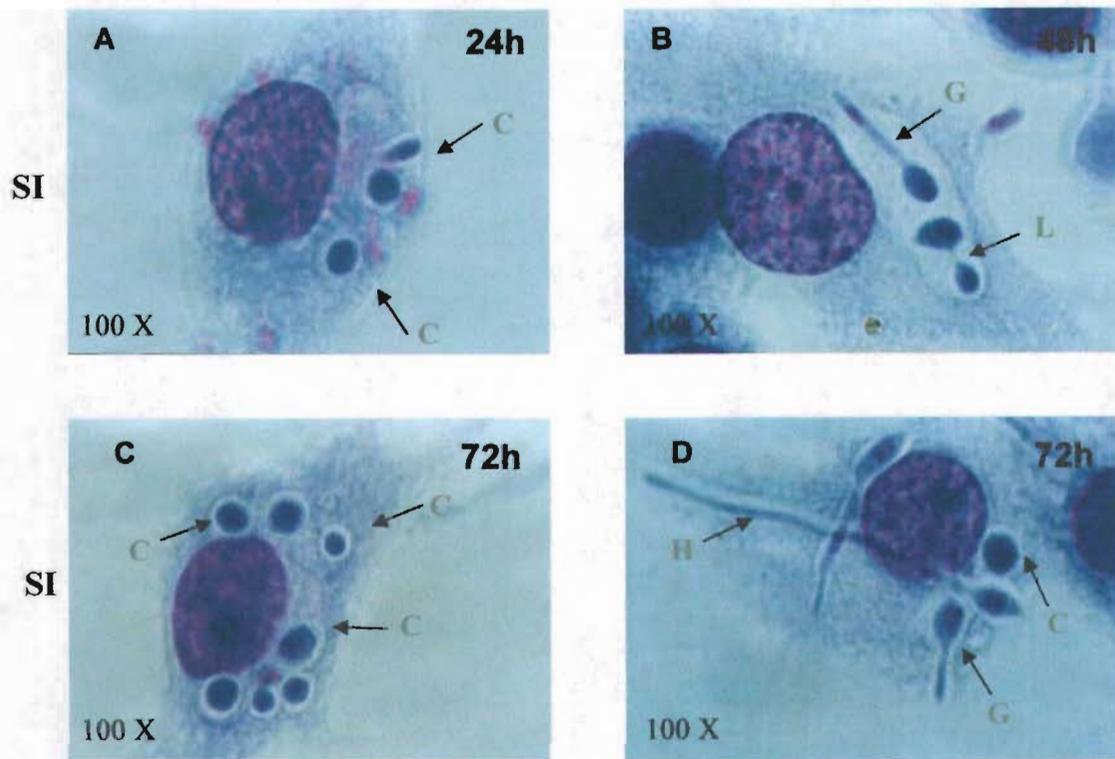
**E)** Los macrófagos infectados con conidios viables opsonizados con suero inmune descomplementado también mostraron a las 24 h conidios íntegros en vacuolas endocíticas (Fig. 13 A), identificándose a las 48 h levaduras extracelulares adheridas a la membrana del macrófago (Fig. 13 B) y a las 72 h hifas y levaduras gemantes dentro del macrófago (Fig. 13 C).



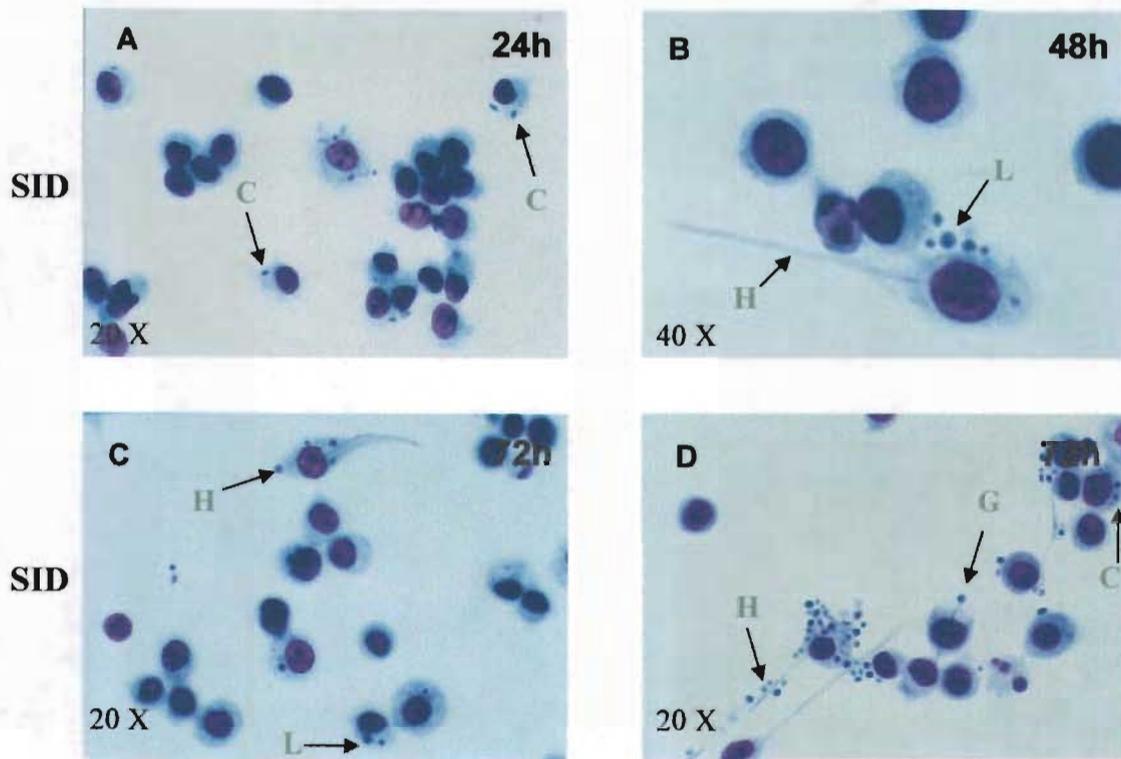
**Fig. 10 Micrografías de la transición dimórfica de conidios de *S. schenckii* en macrófagos U-937. A y B) Control de conidios muertos no opsonizados (NO), observar que en los campos no se observa ninguna morfología del hongo. C, D, E y F) Macrófagos con conidios no opsonizados viables. Tinción de Giemsa. Las flechas con letras indican las distintas morfologías del hongo presentes en las monocapas: (L) levaduras, (G) germínulas, (C) conidios y (H) hifas. En cada micrografía se indica su ampliación y el tiempo de incubación del hongo con los macrófagos.**



**Fig. 11 Micrografías de la transición dimórfica de conidios de *S. schenckii* en macrófagos U-937. A-D) Macrófagos con conidios viables opsonizados con IgG anti-*Sporothrix Schenckii* incubados durante 24, 48 y 72 h a 37°C. Tinción de Giemsa. Las flechas con letras indican las distintas morfologías del hongo presentes en las monocapas: (L) levaduras, (G) germinulas, (C) conidios y (H) hifas. En cada micrografía se indica su ampliación y el tiempo de incubación del hongo con los macrófagos.**



**Fig. 12 Micrografías de la transición dimórfica de conidios hialinos de *S. schenckii* en macrófagos U-937. A-D) Macrófagos U-937 infectados con conidios viables opsonizados con suero inmune (SI) incubados durante 24, 48 y 72 h a 37°C. Tinción de Giemsa. Las flechas con letras indican las distintas morfologías del hongo presentes en las monocapas: (L) levaduras, (G) germínulas, (C) conidios y (H) hifas. En cada micrografía se indica su ampliación y el tiempo de incubación del hongo con los macrófagos.**



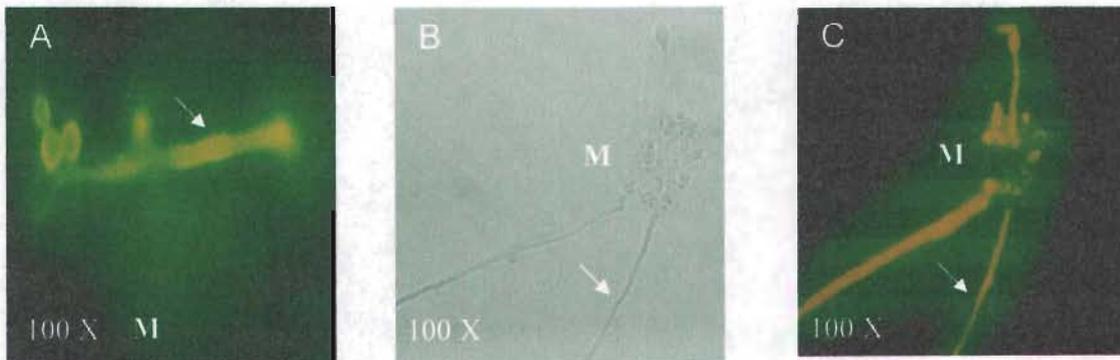
**Fig. 13 Micrografías de la transición dimórfica de conidios hialinos de *S. schenckii* en macrófagos U-937. A-D) Macrófagos U-937 infectados con conidios viables opsonizados con suero inmune descomplementado (SID) incubados durante 24, 48 y 72 h a 37°C. Tinción de Giemsa. Las flechas con letras indican las distintas morfologías del hongo presentes en las monocapas: (L) levaduras, (G) germínulas, (C) conidios y (H) hifas. En cada micrografía se indica su ampliación y el tiempo de incubación del hongo con los macrófagos.**

En las infecciones de macrófagos U-937 con conidios de *S. schenckii* hasta las 72 h se observó que los conidios viables no son destruidos en las vacuolas endocíticas y son capaces de iniciar la transición dimórfica en estas, las imágenes sugieren que los conidios dan origen a las germinulas e hifas y estas últimas en el medio extracelular se observaron generando levaduras en el extremo apical o lateral (fig. 10 F). Aunque también se observaron levaduras intracelulares gemando (fig. 12 B).

### 1.1 Las hifas de *S. schenckii* son capaces de atravesar la membrana celular del macrófago sin afectar su viabilidad.

En las monocapas de macrófagos donde se llevo a cabo la transición dimórfica se observaron hifas largas dentro de los macrófagos (Fig. 10 E y F, 11 D), para determinar si las hifas se encontraban extracelularmente sobre el macrófago o intracelularmente atravesando la membrana celular se fijo la laminilla a) con metanol el cual permeabiliza la membrana del macrófago y b) con paraformaldehído (PFA) que deja intacta la membrana celular. Estas laminillas se incubaron con el anticuerpo IgG-FITC.

Los resultados muestran que en las células fijadas con metanol se marcaron las hifas con FITC a todo lo largo de la estructura (Fig. 14 A), mientras que en la laminilla fijada con PFA se observaron hifas marcadas exclusivamente en los extremos (Fig. 14 C). Los resultados sugieren que las hifas son capaces de atravesar la membrana celular del macrófago escapando de las vacuolas endocíticas, sin afectar la viabilidad de este.

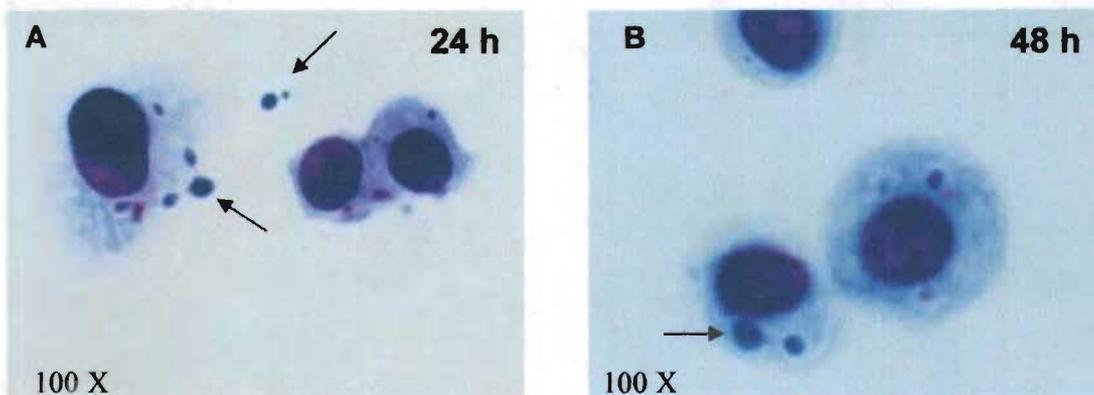


**Fig. 14 Micrografías en las que se muestra que las hifas son capaces de atravesar la membrana celular del macrófago. A)** Control fijado con metanol absoluto, se observó que el anticuerpo IgG-FITC marcó toda la hifa. **B y C)** laminilla fijada con PFA, en B se puede observar claramente la continuidad de la hifa en campo claro y en C se muestra una hifa interrumpida marcada con FITC en campo oscuro. La flecha señala la hifa y la M indica el contorno del macrófago.

## 2. Transición dimórfica de conidios de *S. schenckii* en macrófagos U-937 en presencia de cloruro de amonio.

El cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) es una base débil que se ha demostrado que tiene la propiedad de elevar transitoriamente el pH intravesicular mientras esta presente en el medio de cultivo (Heming, et al., 2003). En experimentos realizados por Travassos sugieren a las hifas como fase intermedia en la transición dimórfica de conidios a levaduras (Travassos, et al., 1978). *In vitro* la formación de hifas se favorece en medios con pH ácido (4.5 – 6.5) y a pH neutro se favorece el desarrollo de levaduras. Por lo que se probó si la incubación de las monocapas con cloruro de amonio se observaría una transición directa de conidios a levaduras.

Los resultados mostraron que el cloruro de amonio a un pH de 7.4 inhibió parcialmente la formación de hifas en el medio extracelular. También se observó una disminución en la generación de germínulas incrementando la presencia de levaduras intracelulares, como se observa en la Fig. 15.



**Fig. 15** Micrografías de la transición dimórfica de conidios de *S. schenckii* en macrófagos U-937 en presencia de cloruro de amonio pH 7.4. A y B) Macrófagos U-937 infectados con conidios viables no opsonizados. Tinción de Giemsa. Las flechas indican las levaduras del hongo presentes en las monocapas. En cada micrografía se indica su ampliación y el tiempo de incubación del hongo con los macrófagos.

## 3. Viabilidad de los macrófagos.

En la metodología de fluorescencia la viabilidad de los macrófagos U-937 postinfección se mantuvo en un 99%, a los 30 y 60 min, garantizando que el tratamiento con azul tripano posterior a la fagocitosis para eliminar la fluorescencia de los conidios extracelulares no fue accesible a los conidios marcados con FITC fagocitados.

En cuanto a la transición dimórfica la viabilidad de los macrófagos infectados con conidios hialinos durante 24, 48 y 72 h en todas las condiciones experimentales fue superior al 98%.

## DISCUSIÓN.

Los macrófagos tienen una función muy importante en la defensa del hospedero contra los microorganismos patógenos. La interacción inicial entre estos puede dividirse en dos categorías: mecanismos opsónicos y no opsónicos. Se ha sugerido que la fagocitosis no opsónica es activa en áreas del cuerpo donde la concentración de opsoninas es baja (Roecklein, et al., 1992).

En la etapa inicial de la infección los conidios de *S. schenckii* son inoculados mecánicamente en la dermis y epidermis del hospedero. Se sabe que en estos tejidos la concentración de opsoninas es mínima, lo que sugiere que *in vivo* los conidios de *S. schenckii* se unen a los receptores de las células fagocíticas a través de los carbohidratos presentes en la superficie de la pared celular del hongo, como manana y glucana. Se han caracterizado familias de receptores que reconocen a estos carbohidratos en macrófagos de diferente origen (East, 2002, Brown, et al., 2002, Herre, et al., 2004).

La baja interacción entre la célula fagocítica y el hongo encontrada en este trabajo, puede explicarse por la presencia en la superficie celular del hongo, de residuos de ácido siálico que lo protegen de la fagocitosis (Oda, et al., 1983). También se ha sugerido que la edad del cultivo es un factor importante en la capacidad de unión al macrófago, ya que se ha demostrado variación de los componentes de la pared celular del conidio. La pared celular de los conidios de 7 días de cultivo (utilizados en este estudio) tienen mayor contenido de ramnosa, el aumento de este carbohidrato confiere protección a la fagocitosis (Fernández, et al, 2000).

La fagocitosis es un mecanismo activo el cual depende de energía, temperatura y disponibilidad de receptores. Las condiciones utilizadas en este trabajo fueron la interacción de macrófagos y conidios a 4°C y la fagocitosis a 37°C. Los conidios no opsonizados fueron fagocitados en dos fases observándose en la cinética dos picos máximos a los 60 min y a las 5 h (Fig. 5). Este comportamiento sugiere que a los 60 min se saturó el sistema de receptores y el reciclado de los mismos fue de 3 h. El segundo proceso de fagocitosis tuvo su mayor expresión a las 5 h.

La fagocitosis tan limitada de conidios no opsonizados sugirió que el hongo requiere de la unión a su superficie de moléculas que faciliten su fagocitosis. Las opsoninas principales son los anticuerpos que se unen a la partícula por su región variable y a la célula fagocítica por su fracción Fc. El suero es un elemento complejo que contiene inmunoglobulinas, componentes del complemento, factores B, D y albúmina, entre otros, los cuales se han identificado como opsoninas. En este trabajo observamos el efecto del suero inmune e IgGs purificadas en el proceso de fagocitosis. Nuestros resultados mostraron que la opsonización con suero e IgG incrementaron la eficiencia en la internalización del conidio (Fig. 7 y 9) y esta es dependiente de la concentración de suero e IgGs, lo que sugiere que las IgGs del suero participan en la unión del conidio al macrófago. Un resultado esperado es que la fagocitosis fuera dosis dependiente y llegara a un punto donde se llegue a la saturación del sistema de unión (4°C) y fagocitosis, sin embargo, se observó

que aún a muy altas concentraciones de proteína IgG (1 mg/ml) el sistema no se saturó. Una posible explicación para este comportamiento es que los anticuerpos tienden a agruparse con los conidios y sean ingeridos juntos.

No se observó una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en la fagocitosis cuando se inactivo el complemento (Fig. 7) lo que demuestra que este no participa en la fagocitosis de los conidios de este hongo, en contraste a lo que sucede con *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* (Sturtevant, et al., 1992), donde el complemento es un factor muy importante en el proceso de fagocitosis.

El suero total tiene una concentración de IgGs de aproximadamente 10 mg/ml, de estas se calcula que el 10% están dirigidas contra los antígenos del hongo, por lo tanto del suero diluido 1:10 que se uso para opsonizar los conidios, 100 µg/ml corresponden a IgG. Al comparar los índices fagocíticos de los conidios opsonizados con suero inmune diluido 1:10 y con 100 µg/ml de IgG purificada se observó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) a los 60 min 0.388 y 0.138, respectivamente. Sólo cuando se opsonizaron los conidios con 1 mg/ml de IgG se alcanzó un índice fagocítico semejante al obtenido con suero diluido 1:10: 0.367 y 0.388, respectivamente. Estos datos sugieren que en el suero además de las IgG existen otros factores humorales que incrementan de forma significativa la fagocitosis del hongo, habiendo demostrado en este estudio que no es el complemento.

En este trabajo mostramos que los conidios no opsonizados de *S. schenckii* se unen al macrófago y son fagocitados en forma muy limitada. Sin embargo, cuando se utilizó suero completo e IgGs purificadas como opsoninas, la unión y la fagocitosis de los conidios incrementó significativamente.

Los patógenos intracelulares han evolucionado diferentes mecanismos para sobrevivir al medio hostil del hospedero. Una vez que estos han internalizado crean un nicho favorable dentro del cual pueden crecer y replicarse.

*In vitro* se ha demostrado que el conidio se diferencia a germínulas e hifas a pH ligeramente ácido (Betancourt, et al., 1985) mientras que la levadura se desarrolla a pH neutro (Resto, et al., 1988).

En la línea celular de macrófagos U-937 los conidios hialinos de *S. schenckii* fueron capaces de germinar dentro de las vacuolas endocíticas y penetrar la membrana celular de los macrófagos, sin afectar la viabilidad de estos (Fig. 14). Lo anterior sugiere que las vacuolas donde se produce la germinación del conidio tienen un pH ácido ya que *in vitro* se ha demostrado que induce el crecimiento apical. En *Candida albicans* también se reportó que el pH del fagolisosoma favorece la formación del tubo germinal dando lugar a la destrucción del macrófago (Wasylnka, et al., 2003). La acidificación del fagolisosoma se ha asociado con la capacidad de *Cryptococcus neoformans* para sobrevivir dentro del macrófago (Levitz, et al., 1999). En contraste se ha descrito que *Histoplasma capsulatum* para sobrevivir dentro del macrófago es capaz de mantener el pH de 6 a 6.5 por inhibición de la fusión fagolisosomal y reclutamiento de la ATPasa vacuolar del hospedero (Newman, et al., 1999).

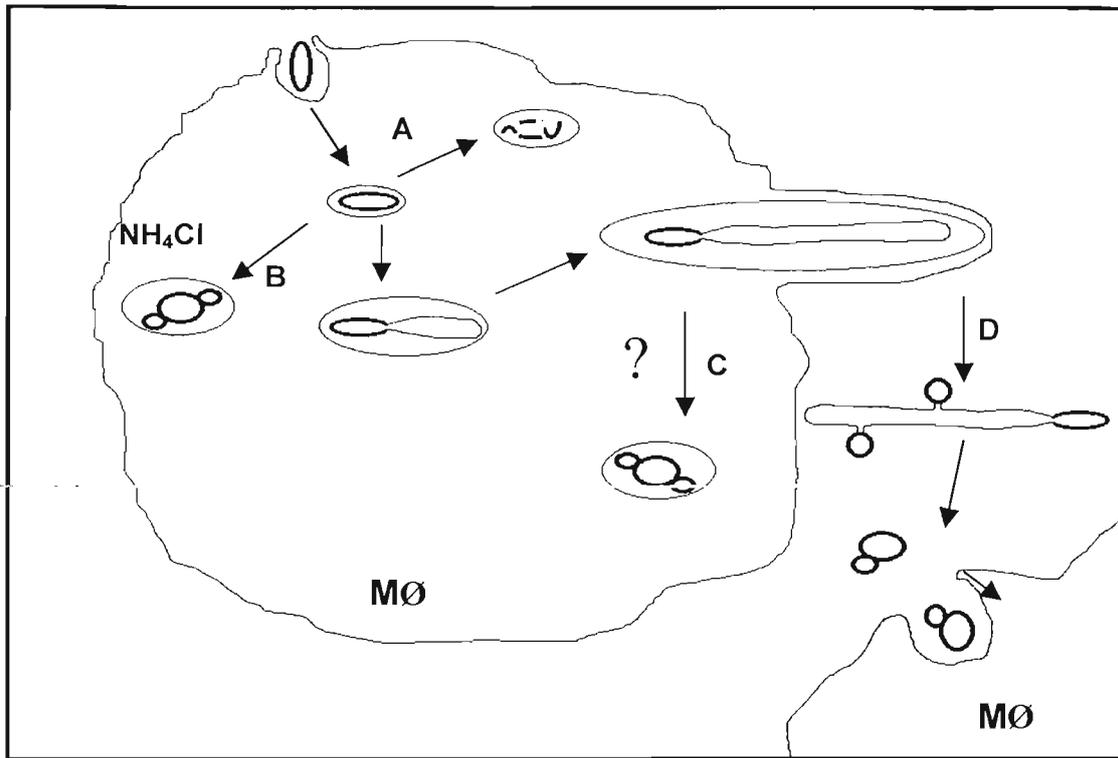
Para determinar si el cambio de pH intravesicular favorece la diferenciación hacia la fase isodiamétrica y formación de levaduras gemantes, el cultivo infectado con conidios se expuso a cloruro de amonio pH 7.4 para mantener el pH intravesicular neutro. La inhibición parcial de la formación de las germínulas en estas condiciones sugiere que *S. schenckii* debe tener una estrategia que le permite sobrevivir dentro de vacuolas endocíticas ya sea regulando el pH intravesicular o sobreviviendo a pH ácido.

Los conidios no opsonizados o bien tratados con suero inmune completo, suero inmune descomplementado e IgG se diferenciaron dentro del macrófago a las diferentes morfologías del hongo (germínulas, hifas y levaduras). Estos resultados muestran que hay poblaciones de conidios capaces de evadir su destrucción dentro del macrófago independientemente de la vía por la cual fueron internalizados.

Interpretando las micrografías del cambio morfológico del conidio dentro del macrófago, se sugiere el siguiente modelo de transición dimórfica:

La transición de los conidios dentro del macrófago inicia con la formación de una germínula dentro de las vacuolas endocíticas del macrófago. Posteriormente, esta se desarrolla en hifa la cual es capaz de atravesar la membrana celular del macrófago con mínimo daño a la célula hospedera y una vez que la hifa tiene acceso a los nutrientes extracelulares y se encuentra en un pH más cercano a la neutralidad lleva al término de la transición dimórfica con la formación de levaduras a partir de los extremos apicales y laterales de la hifa. Se sugiere que estas levaduras pueden continuar la diseminación de la infección internalizándose a otro macrófago (Fig. 16 D).

Otra vía que el conidio puede seguir es hacia la fase de levadura de una forma directa utilizando un mecanismo de regulación del pH dentro de la vacuola endocítica que permite la transición dimórfica (Fig 16 B). Por otro lado se ha descrito que un número importante de conidios es destruido intracelularmente por la activación del estallido respiratorio (fig. 16 A) (Romero, et al., 2000, Fernández, et al., 2000).



**Fig. 16 Modelo propuesto de distintos destinos intracelulares y transición dimórfica de *Sporothrix schenckii*.** El conidio se une a su receptor y por un mecanismo dependiente de actina el conidio es internalizado en una vacuola endocítica, existiendo distintas vías de destino intracelular del hongo: **A)** el conidio es destruido en el fagolisosoma, **B)** el conidio en un pH intravesicular neutro proporcionado por el NH<sub>4</sub>Cl origina directamente una levadura, **C)** la hifa podría desarrollarse en levadura y **D)** la germínula se transforma en hifa, la cual escapa al medio extracelular en donde tiene acceso a los nutrientes y pH adecuados para originar levaduras a partir de su extremo apical y/o lateral y una vez liberada, la levadura puede ser fagocitada por otro macrófago (MΦ) conduciendo a la propagación de la infección.

## CONCLUSIONES

- La fagocitosis de los conidios de *Sporothrix schenckii* no opsonizados fue mínima sugiriendo que en esta línea celular de macrófagos existe un número bajo de receptores para los antígenos presentes en la pared celular de esta fase del hongo.
- La opsonización de los conidios con suero anti-*S. schenckii* e IgGs anti-*S. schenckii* aumentó la eficiencia de fagocitosis en macrófagos U-937 y esta fue dosis-dependiente.
- El complemento no participa en la fagocitosis de conidios hialinos de *S. schenckii* en esta línea celular de macrófagos U-937.
- El hongo *Sporothrix schenckii* tiene la capacidad de evadir la destrucción por los fagocitos, permaneciendo viable dentro de los macrófagos U-937 en vacuolas endocíticas gigantes y realizando la transición a la fase parasitaria de levadura.
- En macrófagos U-937 los conidios internalizados llevaron a cabo la transición dimórfica de la fase conidial a la fase levaduriforme, pasando por la fase intermedia de hifas.
- El cloruro de amonio pH 7.4 favoreció la transición dimórfica de conidio a levadura e inhibió parcialmente la formación de las hifas.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Aderem, A. and Underhill, D. 1999. "Mechanisms of phagocytosis in macrophages". Annu. Rev. Immunol. 17:593-623.
- Bar, Z. and Goldman R. 1976. "Concanavalin A-mediated attachment and ingestion of yeast cells by macrophages". Experimental Cell Research. 99:221-236.
- Castro, F.C., Cunha, L.O., Carvalho, L., Lopes-Bezerra, L.M. and Morandi, V. 2004. "The in vitro interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules". Microbial Pathogenesis. 36:177-188.
- Cunningham, K.M., Bulmer, G.S. and Rhoades, E.R., 1979. "Phagocytosis and intracellular fate of *Sporothrix schenckii*". J. Infectious Diseases. 140:815-817.
- De Araujo, T., Marques A.C. and Kerdel F. 2001. "Sporotrichosis". International J. of Dermatology. 40:737-742.
- Duclos, S., Diez, R., Garin, J., Papadopoulou, B., Descoteaux, A. and Desjardins, Michel. 2000. Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. J. of Cell Science. 113:3531-3541.
- Fernandes, K.S.S., Mathews H.L. and Lopes B.L.M. 1999. "Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components". J. Med. Microbiol. 48:195-203.
- Fernandes, K.S.S., Coelho, A.L.J., Lopes, B.L.M. and Barja-Fidalgo, C. 2000. "Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide". Immunology. 101:563-569.
- Groppe, L., Goldman, W.E. and Schlesinger, H.P. 1993. "*Histoplasma capsulatum* modulates the acidification of phagolysosomes". J. Exp. Med. 177:1605-1611.
- Heming, A.T., Bulayeva, N.N. and Bidani A. 2003. "Cell alkalosis elevates cytosolic Ca<sup>2+</sup> in rabbit resident alveolar macrophages". Clinical Science. 105:21-28.

- Hiruma, M., Kawada, A., Noda, T., Yamazaki, M. and Ishibashi, A. 1992. "Tissue response in sporotrichosis: light and electron microscopy studies". Mycoses. 35:35-41.
- Ibrahim, G.O., Philippe, B., Boleti, H., Boisvieux-Ulrich, E., Grenet, D., Stern, M. and Latgé, J.P. 2003. "Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophage". Infection and Immunity. 71:891-903.
- Jo-Anne, H., Burik, V. and Magee P.T. 2001. "Aspects of fungal pathogenesis in humans". Annu. Rev. Microbiol. 55:743-772.
- Kurokawa, C.S., Sugizaki, M.F. and Peracoli, M.T. 1998. "Virulence factors in fungi of systemic mycoses". Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 40:125-135.
- Levitz, S.M., Nong, S., Seetoo, K.F., Harrison, T.S., Speizer, R.A. and Simons, E.R. 1999. "*Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages". Infection and Immunity. 67:885-890.
- Mansour, K.M. and Stuart L.M. 2002. "Interactions of fungi with phagocytes". Current Opinion in Microbiology. 5:359-365.
- May, C., R. and Machesky, M., L. 2001. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. Journal of cell science. 114:1061-1077.
- Montgomery, R.R., Nathanson, M.H. and Malawista, S.E. 1994. "Fc and Non-Fc Mediated phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* by macrophages". J. Infec. Dis. 170:890-893.
- Morris, J. R., Youngchim, S., Gómez, L. B., Aisen, P., Hay, J. R., Nosanchuk, D. J., Casadevall, A. and Hamilton, A. J. 2003. "Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection". Infection and Immunity. 71: 4026-4033.
- Noah, D.E., Darzacq, X., Astarie-Dequeker, C., Daffé, M., Catalaf, J. and Maridonneau-Parini, I. 1998. "Fusion of azurophil granules with phagosomes and activation of the tyrosine kinase Hck specifically inhibited during phagocytosis of Mycobacteria by human neutrophils". J. Immunology. 161:4983-4991.

- O'Brien D.K. and Melville S.B., 2000. "The anaerobic pathogen *Clostridium perfringens* can escape the phagosome of macrophages under aerobic conditions". Cellular Microbiology. 2:505-519.
- Oda, L.M. Kubelka, C.F. Alviano, C.S. and Travassos L.R. 1983. "Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages". Infection and Immunity. 39:497-504.
- Peng-Cheng, L. Yoshiike, T., Yaguchi, H. and Ogawa, H. 1993. "Histopathological studies of *Sporothrix schenckii*-inoculated mice". Mycopathologia. 122:89-93.
- Roecklein, A.J., Swartz, P.R. and Yeager, H. 1992. "Nonopsonic uptake of *Mycobacterium avium* complex by human monocytes and alveolar macrophages". J. Lab. Clin. Med. 119:772-781.
- Rippon, J.W., 1990, Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic Actinomycetes, p.325, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Rojas, E. 1997. "Bioquímica de la fagocitosis: Una breve revisión". Bioquimia. 22:612-636.
- Romero, M. R., Wheeler, M., Guerrero, P. A., Rico, G. and Torres, G. H. 2000. "Biosíntesis and Functions of Melanin in *Sporothrix schenckii*". Infection and immunity. 68:3696-3703.
- Ruíz, E.J., Arenas, R. y Vega, M.M.E. 1996. "Esporitricosis: Estudio histopatológico de 22 casos". Dermatología Rev. Mex. 40:106-112.
- Strasser, J.E., Newman, S.L., Ciruolo, G.M., Morris, R.E., Howell, M.L. and Dean G.E. 1999. "Regulation of the Macrophage vacuolar ATPase and phagosome-lysosome fusion by *Histoplasma capsulatum*". J. Immunology. 162:6148-6154.
- Sturtevant, J.E. and Latgé, J.P. 1992. "Interactions between conidia of *Aspergillus fumigatus* and human complement component C3". Infection and Immunity. 60:1913-1918.
- Tachibana, T. Matsuyama T. and Mitsuyama, M. 1998. "Characteristic infectivity of *Sporothrix schenckii* to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity". Medical Mycology. 36:21-27.

- Tachibana, T., Matsuyama T., and Mitsuyama, M. 1999. "Involvement of CD4<sup>+</sup> T cells and macrophage in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice". Medical Mycology. 37:397-404.
- Taylor, M.L and Duarte, E.E. 1995. "Strategies of *Histoplasma capsulatum* to circumvent the cytotoxic mechanisms of phagocytes". Rev Invest Clin. 47:499-505.
- Torunn, E., Babita, S., Froystad, M. and Berg, T. 1998. Degradation of phagosomal components in late endocytic organelles. J. Cell Science.111:141-148.
- Travassos, L.R. and Mendonca-Previato L. 1978. "Synthesis of monorhamnosyl L. Rhamno-D-Mannans by Conidia of *Sporothrix schenckii*". Infection and Immunity. 19:1-14.
- Wasylanka J.A. and Moore, M.M. 2003. "Aspergillus fumigatus conidia survive and germinate in acidic organelles of A549 epithelial cells". J. of cell science. 116:1579-1587.

## APÉNDICE

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

#### **Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 10X**

Cloruro de sodio	80 g
Cloruro de potasio	2 g
Fosfato dibásico de sodio	14.4 g
Fosfato monobásico de potasio	2.4 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza por autoclave.

\*En todos los casos descritos en esta tesis el PBS se usó a una dilución en agua destilada a 1X.

#### **Medio RPMI**

Medio RPMI 1640

Agua destilada c.b.p. 1000 ml

Ajustar el pH a 7.2 por filtración y almacenar a 4°C.

#### **Amortiguador de carbonatos pH 9.4 0.1 M**

Carbonato de sodio 1.36 g

Bicarbonato de sodio 3.67 g

Agua destilada c.b.p. 1000 ml

Ajustar el pH a 9.4 y esterilizar por autoclave

### PROCEDIMIENTO DE ELISA.

Se sensibilizó la placa con 1.8, 3.6 y 7.2  $\mu\text{g/ml}$  el hongo *S. schenckii* como antígeno/ pozo en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ . Se incubó la placa de 96 pozos durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se desecho el contenido y se lavó con PBS-Tween 20 al 0.1%. Se bloqueo cada pozo con 200  $\mu\text{l}$  PBS-Tween 20, leche descremada en polvo al 5% durante 1 h a 37°C. Se lavó con PBS-Tween 20. Luego se incubó con suero inmune anti-*Sporothrix schenckii* hecho en conejo diluido en PBS-Tween-leche descremada en un volumen de 100  $\mu\text{l}$ /pozo durante 1 hora. Se incluyó el suero preinmune como control. Se lavó la placa minuciosamente con PBS-Tween 20. Se incubó la placa con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa (anti-IgG preoxidase de sigma) diluido 1:7000 en un volumen de 100  $\mu\text{l}$ /pozo. Se incubó la placa por 1 h a 37°C. Se realizaron lavados exhaustivos con PBS-Tween. Se procedió a la incorporación del sustrato incubando con 100  $\mu\text{l}$ /pozo de amortiguador de citratos pH 5.6,  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% y ortofenilenediamina, se incubó durante 15 min en la oscuridad. Se detuvo la reacción con 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2.5 N. Por último, se analizó la placa en un lector de ELISA a una densidad óptica de 490 nm.

## PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN DE IgG anti-*S. schenckii* POR LOWRY.

### Soluciones

- A  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.5%
- B Tartrato de sodio y potasio 2%
- C Carbonato de sodio 2% en NaOH 0.1 N
- D Mezclar un volumen de A + un volumen de B
- E Mezclar 50 volúmenes de C + un volumen de D

Reactivo de Folín-Ciocalteau diluir 1:1 un momento antes de iniciar el método.  
Albúmina como estándar.

Se colocó 1 ml de solución de proteína problema en un tubo de ensayo, procesándolo junto con la curva de albúmina (20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g}$ ). Se agregó a cada tubo 5 ml de solución E, se mezcló cada tubo y se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente. Se agregó a cada tubo 0.5 ml de reactivo de folín agitando inmediatamente y se incubó durante 30 min en la oscuridad. Posteriormente, se cuantificó en el espectrofotómetro a 750 nm la absorbancia.