



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR CONTRA EL HONGO  
*SPOROTHRIX SCHENCKII* UTILIZANDO LA TOXINA DEL CÓLERA COMO  
ADYUVANTE**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**ALBERTO GARCÍA LOZANO**



**MÉXICO, D.F.**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** DR. RODOLFO PASTELÍN PALACIOS

**VOCAL:** DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO

**SECRETARIO:** DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

**1er. SUPLENTE:** DRA. SONIA MAYRA PÉREZ TAPIA

**2° SUPLENTE:** QFB. GIBRÁN PÉREZ MONTESINO

**EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES, DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, EN EL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.**

---

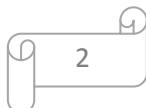
DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO.

**ASESOR**

---

ALBERTO GARCÍA LOZANO.

**SUSTENTANTE**



## *DEDICATORIA.*

*A MIS PADRES, POR QUE ESTE SUEÑO LO HICIMOS REALIDAD JUNTOS*

*A MIS HERMANOS Y FAMILIA, POR SU APOYO INCONDICIONAL*

*A KARINA, POR SU TIEMPO Y COMPRENSIÓN DIARIA*

*A MIS AMIGOS, POR SU AMISTAD SINCERA*

*A MIS PROFESORES, POR SU CONSEJO*

*A DIOS, POR LA VIDA*

## AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Laura Bonifaz por el conocimiento aprendido y por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio bajo su cargo e instrucción, en el desarrollo de este proyecto.
- A cada uno de los trabajadores del bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, ubicada en el Hospital General de México por la colaboración brindada, en el cuidado de los ratones utilizados en este proyecto.
- A la Q.F.B. Amelia de los Ángeles Pérez Mejía y la Dra. Concepción Toriello Nájera del Laboratorio de Micología Básica, del Departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Medicina de la UNAM por su colaboración en este trabajo al proporcionarme la cepa del hongo y la esporotricina utilizada, así como por sus consejos durante la realización de este proyecto.
- Al Dr. Alejandro Bonifaz del Hospital General de México por su instrucción y apoyo en el manejo del hongo.
- A Gibrán, David, Marcela, Iliana, Octavio, Isaac, Adrian, Tania, Rosauora, Rosita, Gaby, Aniela, Paty, Paty Rojo, Ana Clara, Luz María y Elizabeth, por su apoyo y consejos en el aprendizaje de nuevas técnicas experimentales, así como por su amistad y compañerismo que hicieron aun más agradable mi estancia en la UIMEA.
- Nuevamente a mis padres, ya que gracias a su esfuerzo diario, ya sea de día o de noche, fue posible la culminación de este proyecto, que es tanto mío como de ellos.
- A mis hermanos que siempre me apoyaron con sus conocimientos para suplir así, la deficiencia de los míos y poder llevar a cabo la culminación de este proceso.
- A mi familia entera por su apoyo incondicional y motivación, pues nunca han dejado de creer en mí y han sido esenciales en mi desarrollo personal.
- A Karina Flores Robles por su cariño sincero y comprensión, ayudándome cada día a ser una mejor persona.
- A cada uno de mis amigos que me han brindado su amistad y que hicieron más divertida y agradable mi estancia en la facultad.
- A mis profesores por el conocimiento aprendido y por su dedicación, que me permitieron convertirme en una mejor persona.

## ÍNDICE

➤ RESUMEN.....	6
➤ INTRODUCCIÓN.....	8
❖ <i>Sporothrix schenckii</i> .....	8
❖ Esporotricosis.....	9
• Antecedentes Históricos.....	9
• Epidemiología.....	10
• Patogenia.....	11
• Aspectos clínicos.....	12
• Diagnóstico de laboratorio.....	14
• Tratamiento.....	15
➤ ANTECEDENTES.....	17
❖ <i>Sporothrix schenckii</i> y respuesta inmune.....	17
❖ Esporotricina.....	19
❖ Conidias.....	20
❖ Células del Sistema Inmune en la piel.....	21
❖ Toxina del Cólera y la sub-unidad pentamérica $\beta$ no tóxica de esta toxina.....	24
➤ JUSTIFICACIÓN.....	26
➤ OBJETIVO.....	27
➤ HIPÓTESIS.....	27
➤ METODOLOGÍA.....	27
❖ Hongo.....	27
❖ Esporotricina.....	28
❖ Anticuerpos y Reactivos.....	28
❖ Ratones.....	28
❖ Respuesta tipo DTH y tinción de linfocitos.....	29
➤ RESULTADOS.....	30
➤ ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	46
➤ CONCLUSIÓN.....	51
➤ BIBLIOGRAFÍA.....	52

## RESUMEN.

La Esporotricosis es la micosis subcutánea más frecuente en México y en el mundo. Esta enfermedad es causada por un hongo dimórfico termo-dependiente llamado *Sporothrix schenckii* (SC). Este hongo se encuentra generalmente en la vegetación en su forma micelial (conidias e hifas), mientras que a temperaturas cercanas a 37°C adquiere su forma de levadura. La conidia y/o la hifa, entran en el hospedero por lesiones en la piel o por inhalación, mientras que solo la forma de levadura ha sido observada en biopsias de piel de pacientes con la enfermedad. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son a nivel de piel, pero existen casos reportados de manifestaciones viscerales en pacientes inmunocomprometidos.

Investigaciones anteriores han mostrado que tanto las células T CD4<sup>+</sup> como los macrófagos son importantes en la formación del granuloma, el cual es un componente crítico y esencial en la defensa normal del hospedero contra la infección. Sin embargo, no se conocen los antígenos potenciales de SC y se desconoce si algunos de sus componentes son capaces de inducir una respuesta inmune celular o si es necesario utilizar adyuvantes en la inducción de este tipo de respuesta.

El objetivo central del trabajo fue evaluar la inducción de una respuesta inmune celular después de la inmunización en la piel utilizando como antígenos potenciales a la esporotricina y las conidias inactivadas de SC en presencia o ausencia de la toxina de cólera (TC) como adyuvante.

En este trabajo se utilizaron conidias, que son la unidad de reproducción asexual de SC, además de la esporotricina que es un complejo péptido-polisacárido obtenido de la fase micelial del hongo. Esta última se utiliza en pruebas de intradermorreacción para el diagnóstico de la enfermedad.

Para evaluar la respuesta celular en contra de estos dos antígenos de SC, se utilizaron ratones C57BL/6, a los cuales se les realizaron pruebas de DTH (del inglés delayed-type hypersensitivity) en las orejas. Se inoculó por vía intradérmica (i.d) en la oreja del ratón la esporotricina y las conidias inactivadas, solas o en presencia de la TC o la subunidad  $\beta$  no tóxica de esta toxina (CTB); después de 7 o 31 días se retó en la misma oreja y en la oreja contraria con esporotricina o con conidias respectivamente en ausencia de adyuvante. Las pruebas de hipersensibilidad tardía mostraron que tanto la conidia inactivada como la esporotricina, son incapaces de desarrollar una respuesta celular por si

solas. Sin embargo, tanto la TC completa como la CTB lograron inducir una DTH la cual fue más evidente en el caso de las conidias. Correlacionando con la inducción de una respuesta DTH en los ratones inmunizados con la CTB y conidias de SC se observó una importante infiltración de linfocitos T CD4 con fenotipo de memoria en la epidermis de los ratones.



## INTRODUCCIÓN.

### **Sporothrix schenckii (SC).**

*Sporothrix schenckii* es un hongo dimórfico, es decir posee una fase micelial y una levaduriforme, además es termo-dependiente y el agente causal de la esporotricosis. La esporotricosis es la micosis subcutánea más frecuente en México y el mundo (1, 2), afecta primordialmente la piel y ganglios linfáticos, pero en individuos inmunocomprometidos llega a dañar huesos, articulaciones y órganos profundos (1).

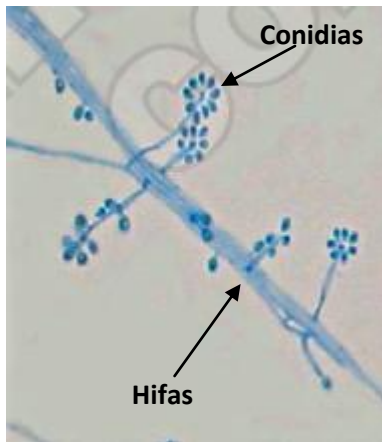
La forma micelial de este hongo (compuesta por conidias e hifas), se encuentra en el suelo y vegetación (madera, hojas, ramas, etcétera) de ciertas zonas de México y el mundo que poseen climas templados y húmedos, con un promedio de temperatura de 20 a 25°C y una humedad relativa superior al 90% (1, 2). La fase levaduriforme ha sido observada en biopsias de pacientes con esporotricosis y mediante el cultivo de este hongo a 37°C en medios ricos en nutrientes como el gelosa-sangre o agar BHI (5).

Durante la fase micelial, su pared celular se encuentra compuesta por glucanos  $\beta$  y glucopéptidos (péptidos-ramnomananos) los cuales son reconocidos como fracciones antigénicas por el sistema inmune. Estos glucopéptidos se encuentran constituidos en un 14.2% por proteínas y en un 86.4% por carbohidratos, donde los principales azúcares son la ramnosa y la manosa (2).

La fase micelial se obtiene a una temperatura de 28°C en medios de cultivos de agar Sabouraud, micosel agar y agar papa-dextrosa. Las colonias se desarrollan rápidamente alrededor de 3 a 4 días (2). Al microscopio se observan hifas muy delgadas, de 1-3  $\mu\text{m}$  de diámetro, septadas, ramificadas e hialinas. Su reproducción asexual es a base de microconidias (1).

La fase levaduriforme se obtiene a 37°C en los medios de cultivo antes mencionados y se puede estimular su crecimiento cultivándolos en una atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$ . El desarrollo de colonias se obtiene de 3 a 5 días y al microscopio se observan células levaduriformes, ovoides o alargadas que miden de 2 a 4 por 3 a 6  $\mu\text{m}$  (1).

A)



B)



Imagen 1. A) Imagen al microscopio de SC en su forma micelial, al cual se le sometió a una tinción previa con azul de algodón. B) Imagen al microscopio de SC en su forma de levadura, sometido previamente a la tinción de PAS.

## Esporotricosis

Es una micosis subcutánea producida por el hongo *Sporothrix schenckii* (2, 5). Esta infección afecta primordialmente la piel y ganglios linfáticos en forma de lesiones gomosas, pero en individuos inmunocomprometidos llega a dañar huesos, articulaciones y órganos profundos (1).

### Antecedentes Históricos.

El primer caso de esporotricosis fue visto en 1898 en los E.U.A por Benjamín Schenk (4) en un paciente con esporotricosis linfagítica y del cual se obtuvo el cultivo que posteriormente fue clasificado por Smith (1). Los siguientes casos fueron observados por Hektoen y Perkins nuevamente en E.U.A y por Beurman en Francia. Cada uno de ellos dio clasificaciones diferentes a cada una de sus cepas descubiertas (1). Fue hasta 1962 que Michael terminó con las confusiones en la clasificación de este hongo dándole el nombre de *Sporothrix schenckii* (1, 4).

Los primeros casos mexicanos fueron reportados en 1913 por Gayón y Aguirre Pequeño. Posteriormente en 1947, González-Ochoa junto con Soto-Figueroa extrajeron y purificaron el primer antígeno de naturaleza polisacárida, el cual utilizaron en pruebas intradérmicas (1, 4), para determinar la presencia de una respuesta inmune en personas infectadas con el hongo.

### Epidemiología.

Se han reportado casos en el oeste de Europa en países como Francia, Italia y España, en Asia en los países de India, Tailandia, China y Japón y en África. Aunque se han reportado casos en todos los continentes, el mayor número de infecciones se presentan en América intertropical, sobresaliendo los países de México, Uruguay, Perú, Colombia y Guatemala (1, 4), además en los últimos años ha aumentado el número de casos reportados en Brasil por transmisión zoonótica (4).

En México, la esporotricosis es la micosis subcutánea más frecuente (2) y aunque prácticamente se ha presentado en todos los Estados de la República, las zonas con mayor número de casos son: el occidente (Jalisco y Nayarit) y la zona centro (Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y el Distrito Federal). Esta frecuencia puede deberse a dos razones: la primera a que *S. schenckii* habita estas áreas y la segunda razón, es que a la zona metropolitana ingresan gran cantidad de productos como flores, madera y cajas para verdura y frutas de los Estados circunvecinos que son esporotrigénicos (1).

Este hongo habita generalmente en climas templados y húmedos, con un promedio de temperatura de 20-25°C y humedad relativa superior al 90%.

La enfermedad puede presentarse en cualquier época del año, sin embargo la mayor parte de enfermos se presenta a finales de otoño y principios de invierno. En México, esto puede deberse a que por ser el final de la temporada de lluvias, se alcanza la humedad y temperatura óptimas para el desarrollo del hongo, además de que aumenta la posibilidad de contacto con vegetales y plantas, ya que es la época de cosecha (1).

Como se mencionó, SC vive en el suelo y la vegetación, y estas son la fuente principal de infección con este hongo. Sin embargo, en los últimos años la infección ha sido considerada una de las más importantes enfermedades zoonóticas, es decir a partir de animales que actúan como vectores indirectos de la infección, ya que se ha logrado aislar el hongo de pezuñas y dientes de animales como ratas, ratones y ardillas (4).

La esporotricosis se considera como una enfermedad ocupacional y se presenta sobre todo en campesinos, amas de casa, niños en edad escolar, cultivadores y vendedores de flores, cazadores, mineros y pescadores, entre otros. La principal vía de ingreso es la cutánea, a través de traumatismos con material contaminado por este hongo, sin embargo en individuos que viven en zonas altamente endémicas y se encuentran inmunocomprometidos, el hongo puede penetrar por vía respiratoria y provocar casos pulmonares y sistémicos (1, 11).

### Patogenia.

La esporotricosis cutánea se inicia a través de traumatismos con objetos contaminados con el hongo en su forma micelial (11). La primera lesión se presenta en el sitio de entrada del hongo y, aproximadamente 10 días después de la inoculación, por efecto de la interacción con la respuesta inmune, se forma un complejo cutáneo-linfático denominado granuloma, el cual es crítico y un componente esencial de la defensa normal del hospedero (5). Este se encuentra conformado por una zona central que contiene polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos (5), una zona media o tuberculoide con linfocitos, células gigantes multinucleadas y células de Langerhans (6) y una capa externa conformada por macrófagos, linfocitos y fibroblastos (2). A partir de este momento la enfermedad tiende a seguir dos cursos: en un porcentaje relativamente bajo las lesiones pueden involucionar y curarse espontáneamente, o bien pueden extenderse dando lugar a placas verrugosas o lesiones gomosas escalonadas, que afectan los ganglios linfáticos regionales (1). Sin embargo, si el sujeto se encuentra inmunocomprometido, esta enfermedad puede llegar a diseminarse a órganos profundos (hígado, pulmones, vísceras, etcétera) y llegar incluso a causar una enfermedad sistémica (4, 5).

### Aspectos clínicos.

La distribución más frecuente de la enfermedad en el cuerpo se da en miembros superiores e inferiores, aunque en el caso de los niños también es frecuente encontrarla en la cara.

Debido a las diferentes manifestaciones clínicas en que se presenta la infección con este hongo, existen muchas clasificaciones sin embargo, la mayoría coincide en dividir los aspectos clínicos de acuerdo a la competencia inmunológica del individuo, tal y como lo propone Saúl en 1988, clasificando las diferentes esporotricosis de la siguiente manera (1):

- **Esporotricosis cutáneo-linfática:** Forma más clásica y frecuente (75% de los casos), en la que el individuo infectado desarrolla una respuesta inmune evidenciada por la presencia de granulomas. Se presenta en miembros superiores, inferiores y cara, en donde se forma un chancro esporotricósico después de una o dos semanas de la infección con el hongo y aparecen lesiones en forma lineal y

escalonada en los ganglios linfáticos regionales las cuales poder ser resueltas con los tratamientos convencionales.



- **Esporotricosis cutáneo-fija:** Forma crónica y localizada (25% de los casos), en la que el desarrollo de la respuesta inmune evidenciada por la presencia de granulomas evita la diseminación de la infección, sin embargo la resolución de la infección se logra solamente con el uso de los tratamientos convencionales.



- **Esporotricosis cutáneo-superficial:** Algunos la consideran como una variedad de la esporotricosis cutáneo-fija, pero con la diferencia de que la infección se presenta en individuos inmunocomprometidos, los cuales no desarrollan una respuesta inmune adecuada.



- **Esporotricosis cutáneo-hematógena:** Es la variedad cutánea más rara (1-2% de los casos), se le puede considerar oportunista porque siempre viene asociada de una inmunosupresión. Se puede localizar en cualquier parte de la piel, incluso en mucosas (boca, faringe) y este tipo es el que tiende a una mayor progresión, diseminándose a huesos, articulaciones y otros órganos, incluyendo el sistema nervioso central. Esta variedad no tiende a la curación y tiene por lo general un mal pronóstico.



- **Esporotricosis osteo-articular:** Se presenta en pacientes inmunocomprometidos y afecta principalmente los huesos y las articulaciones.



- **Esporotricosis pulmonar y sistémica:** La esporotricosis pulmonar es considerada una entidad rara, ya que solo se presenta en individuos inmunocomprometidos que viven en regiones altamente endémicas para este hongo, por lo cual existen pocos casos reportados en la literatura.

## Diagnóstico de laboratorio (1).

### **1) Intradermorreacción con esporotricina M (micelial).**

Se ocupa el complejo péptido-polisacárido, obtenido de la fase micelial de SC, el cual se inyecta intradérmicamente en el antebrazo o espalda del sujeto a evaluar. Se puede presentar una respuesta inmediata (5-10 minutos) caracterizada por eritema y prurito que indica la liberación de histamina pero que carece de valor alguno para el diagnóstico. La prueba confirmatoria se obtiene entre las 24 y 48 horas posteriores a la inoculación, formándose una zona indurada y eritematosa con un diámetro mayor a 5 mm.

Esta prueba se trata en si de una respuesta de hipersensibilidad del tipo retardada (DTH por sus siglas en ingles), en la cual se pone en evidencia la presencia de linfocitos CD4<sup>+</sup> de memoria, generalmente del tipo Th1 y en algunos casos del tipo Th17 (3, 32), originados durante la infección con el hongo, los cuales montan una respuesta inmune conformada por la expresión de citocinas como INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , e IL-17, entre otras, las cuales reclutan y activan macrófagos, así como neutrófilos y algunos otros tipos celulares(3).

Sin embargo, esta prueba cuenta con una desventaja para el diagnostico de la infección, ya que debido al desarrollo de memoria inmunológica en contra de este hongo, la inoculación con la esporotricina resulta en pruebas positivas en individuos que no se encuentran infectados por el hongo en ese momento, pero que anteriormente desarrollaron la enfermedad o inclusive que solo estuvieron en contacto con el hongo. Además, existen casos reportados de falsos negativos en pacientes inmunosuprimidos.

### **2) Cultivos.**

Son el mejor método para establecer el diagnóstico. Se realizan a partir del material obtenido de las lesiones, el cual se cultiva en medios como el Sabouraud y micosel agar, a 28°C. Las colonias aparecen en un tiempo promedio de 5 a 8 días.

Debido a que SC es un hongo dimórfico, si el material colectado de las lesiones se siembra en medios de cultivo ricos (gelosa sangre, agar BHI) y se incuba a 37°C, se obtienen colonias levaduriformes.

### **3) Exámenes directos y biopsias.**

No son útiles por que regularmente dan resultados negativos (2), debido a que las levaduras son muy pequeñas y mediante las técnicas convencionales de tinción

como la Tinción de Gram no se hace visible al hongo (1). La tinción más recomendada es la Tinción de PAS (ácido peryódico de Schiff) y Grocott (2). Además la histopatología no es específica y se llega a confundir con otras infecciones por hongos (1).

#### 4) Serología.

Cobran gran importancia en las formas sistémicas y pulmonares de la infección. Las pruebas más importantes son detección de anticuerpos en sangre y la fijación del complemento. Sin embargo debido a la capacidad de SC de generar memoria inmunológica, se pueden presentar casos positivos en individuos que no se encuentran infectados en ese momento, pero sufrieron una infección anterior con este hongo.

#### 5) Técnicas de PCR.

Se han utilizado como técnicas de diagnóstico al amplificar ciertos fragmentos del DNA de SC, como por ejemplo la secuencia de la fracción 26s del RNA ribosomal. Sin embargo, estas técnicas no son muy usadas para el diagnóstico de la enfermedad debido a que son caras y no podrían desarrollarse de manera cotidiana en todos los laboratorios (4).

### Tratamiento (1).

- **Yoduro de potasio (KI):** Es una terapia con buena efectividad, mínimos efectos secundarios, de fácil administración y bajo costo. Sin embargo el tiempo de terapia en los casos más comunes de esporotricosis como lo son el linfagítico y el fijo, es de 3 meses, pero se aconseja continuar el tratamiento por dos meses más para evitar las recaídas. Además en las mujeres embarazadas puede causar hipertiroidismo en el producto.
- **Anfotericina B:** Utilizada en los casos de esporotricosis sistémica, pero su uso acarrea gran cantidad de efectos secundarios y la terapia solo puede administrarse intrahospitalariamente.
- **Griseofulvina:** A pesar de que el tratamiento con este fármaco ha demostrado buenos resultados, no se recomienda debido a que muchos casos han fracasado, el tiempo de tratamiento es más largo (4 a 6 meses) y causa efectos secundarios como cefalea, gastritis y fotosensibilidad.



- **Ketoconazol e itraconazol:** En general los resultados no son tan buenos como los obtenidos con el KI, además de que se emplea por más tiempo y la terapia es mucho más costosa. Mientras que los efectos colaterales reportados para el ketoconazol incluyen hepatotoxicidad y efectos antiandrogénicos. Sin embargo son terapias utilizadas usualmente cuando el tratamiento con KI falla o está contraindicado.
- **Calor local:** Debido a que SC es termo-sensible (no crece a temperaturas mayores a 40°C), se recomienda baños de agua caliente (45°C) durante 15 a 20 minutos tres veces al día. Sin embargo, este tratamiento solo es útil para casos de esporotricosis leves o en el caso de las embarazadas donde los tratamientos anteriormente mencionados son contraindicados y se busca por lo menos evitar la diseminación de la infección.

De tal manera se puede observar que los tratamientos existentes no son del todo eficaces y tiene efectos secundarios importantes. Motivo por el cual se decidió evaluar la respuesta inmune que se desarrolla después de la inmunización en piel de dos diferentes componentes de este hongo, con el objetivo de desarrollar en un futuro una vacuna capaz de inducir una respuesta inmune eficiente en contra de SC y así prevenir las diferentes manifestaciones clínicas provocadas por la infección con este hongo. Para esto se utilizaron a la esporotricina y a las conidias de SC como antígenos potenciales, ya sea solos o en presencia de adyuvantes para la inducción de una respuesta inmune celular.

## **ANTECEDENTES.**

Los datos mencionados indican que la competencia inmunológica de los individuos parece ser crucial en el desarrollo de la micosis causada por SC. Los tratamientos existentes no son del todo eficaces y tienen efectos secundarios importantes. De esta manera el desarrollo de una vacuna contra este hongo que pueda utilizarse en zonas endémicas y sobre todo en individuos inmunocomprometidos sería importante para el control de la diseminación de los distintos tipos de micosis causada por SC.

En este trabajo se evaluó la inducción de una respuesta celular tipo Th1 en el sitio de entrada de este microorganismo (piel) utilizando como antígenos a la esporotricina así como a las conidias de SC inactivadas por calor, solas o en presencia de la toxina del cólera como adyuvante.

### ***Sporothrix schenckii* (SC) y respuesta inmune.**

Estudios recientes han reportado que el hongo *Sporothrix schenckii* forma parte de un grupo de hongos dimórficos denominado “Complejo de *Sporothrix schenckii*”. Este complejo incluye 5 especies que han sido diferenciadas filogenéticamente a través de estudios moleculares y que fueron clasificadas como: *Sporothrix albicans*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix mexicana* y *Sporothrix schenckii*, además últimamente está en discusión la entrada al grupo de otra especie llamada *Sporothrix luriei* (4).

Un estudio realizado en ratones, en el que se comparó la patogenicidad de estas 5 especies de *Sporothrix*, demuestra que las especies más virulentas de este complejo son *S. brasiliensis* y *S. schenckii* (7). Por lo cual basados en su patogenicidad y disponibilidad se decidió trabajar con la cepa EH-143 del hongo SC proporcionada por el Laboratorio de Micología básica, del Departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde obtuvieron esta cepa de lesiones de pacientes con esporotricosis cutáneo-linfática.

A pesar de que la respuesta inmune parece ser crucial en el desarrollo y la severidad de la enfermedad causada por SC, actualmente existen pocos estudios acerca del tipo de respuesta inmune que se desarrolla en contra de este hongo. Varios reportes coinciden en que la respuesta inmune celular es un mecanismo de defensa capaz de

controlar la infección (12), dentro de la cual, la respuesta más eficaz para la erradicación de este hongo es la inducción de una respuesta tipo Th1 que involucra la participación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, macrófagos (13, 14, 23), células dendríticas (incluyendo células de Langerhans (6)) y neutrófilos (8), todas estas células son requeridas para la formación del granuloma, que es un componente crítico y esencial en la defensa del hospedero (2, 5, 6, 15, 20, 24). Se ha demostrado por inmunohistoquímica que los linfocitos presentes en estos granulomas se encuentran produciendo INF- $\gamma$  lo que indica una respuesta del tipo Th1 (4, 5, 14, 15), la cual activa y potencializa las funciones de los macrófagos que se encuentran formando el granuloma (5).

Se conoce que los receptores de reconocimiento de patrones (PRR's) juegan un papel importante en el reconocimiento de microorganismos ya que realizan diversas funciones como la activación del sistema inmune innato, estimulan la producción de citocinas pro-inflamatorias y participan en la modulación de la respuesta inmune adaptativa (16). Algunos estudios han planteado que el reconocimiento de este hongo podría llevarse a través de los receptores tipo Toll TLR-2 y TLR-4 ya que estos inducen la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$  (17, 19), mismas que se han encontrado en cultivos celulares con SC, además de que algunos otros hongos como *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus* son reconocidos a través de estos receptores (5).

Sin embargo, la interacción precisa entre el hongo SC, las células dendríticas (DCs) y los demás tipos celulares que participan en la respuesta inmune contra este hongo, así como los receptores que participan en el reconocimiento de los distintos componentes del hongo no han sido totalmente elucidados.

Por otra parte, como todos los microorganismos, SC cuenta con mecanismos de evasión de la respuesta inmune los cuales podrían estar involucrados en que se desarrolle una RI ineficiente. Por ejemplo algunos estudios reportan que SC evade a las células fagocíticas mediante la invasión de las células no fagocíticas del hospedero, como por ejemplo células epiteliales y células endoteliales, en las cuales promueven su propia endocitosis al unirse a receptores de superficie inducibles en estas células (9). En el caso de SC se descubrió que esta invasión de las células endoteliales la lleva a cabo la forma levaduriforme de este hongo, la cual se une a proteínas inducibles de 90 kDa y 135 kDa en las células endoteliales, sin embargo aun se desconoce el mecanismo de invasión (9). Esto coincide con reportes en los cuales se ha visto que la forma levaduriforme de SC

puede además, escapar de la respuesta inmune del hospedero mediante una baja inducción de la respuesta Th1 y una probable inducción de una respuesta del tipo Th2, debido a que promueve la secreción de altas cantidades de IL-4 (5). Otro factor de virulencia es la producción de melanina en su pared celular, lo que le confiere protección al neutralizar los radicales libres (4) y las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (22), producidas dentro de ciertas células fagocíticas como los macrófagos y neutrófilos. Estas especies reactivas, se ha demostrado, que permiten una correcta actividad fungicida por parte de estas células (8).

De acuerdo con esto si se quiere inducir una respuesta inmune eficiente contra SC, sería importante utilizar componentes del hongo que no participen en los mecanismos de evasión.

Aunque hoy en día aun se desconocen gran parte de los mecanismos de la respuesta inmune que se desarrolla en contra de SC y de la evasión a esta respuesta por parte de este hongo, los diferentes estudios realizados indican la necesidad de un tratamiento complementario a la respuesta inmune del hospedero, para lograr resolver la infección por completo.

### **Esporotricina.**

Desde la primera obtención del antígeno de SC hecha por González-Ochoa en 1947, las esporotricinas han sido tema de múltiples trabajos de investigación. En la actualidad, el mecanismo de obtención de las esporotricinas se ha refinado cada vez más, al utilizar medios mínimos de cultivo que producen antígenos más puros y limpios. Entre estos trabajos destacan los realizados por Mariat, Toriello, Ishizaki, Lloyd y Travassos, entre otros (1).

Debido al dimorfismo de SC, es posible obtener dos tipos diferentes de esporotricinas; la proveniente de la fase micelial y la de la fase levaduriforme. En ambos casos se trata de un glucopéptido, cuya composición química entre ambas es casi la misma (1, 2).

La parte polisacárida contiene: manosa, galactosa, glucosa y ramnosa, este último carbohidrato no ha sido reportado en otros hongos patógenos, por lo que se piensa, le puede conferir cierta especificidad. Mientras que la parte peptídica se encuentra compuesta principalmente por treonina, serina, ácido aspártico y ácido glutámico (1).

Además la fracción polisacárida puede variar dependiendo de la fase del hongo (1, 2). Durante la fase micelial se pueden encontrar estructuras formadas por unidades de dirramnosil-ramnomananas, mientras que en la fase levaduriforme, estas unidades son de monorramnosil-ramnomananas, lo que les podría conferir ciertas diferencias inmunogénicas. (1)

En trabajos realizados por Arenas-López y Toriello sobre estas dos esporotricinas, concluyen que al utilizar la esporotricina obtenida durante la fase micelial se obtiene una mayor reproducibilidad en las pruebas de intradermorreacción y pruebas serológicas que cuando se utiliza la esporotricina obtenida de la fase levaduriforme (64).

Por lo cual, basado en estos trabajos, la esporotricina obtenida de la fase micelial de los cultivos de SC, representa una mejor candidata para ser utilizada como un antígeno potencial de este hongo.

### **Conidias.**

Las conidias forman parte de la fase micelial del hongo y se obtienen a una temperatura de 28°C en medios de cultivos como agar Sabouraud, micosel agar y agar papa-dextrosa después de 3 o 4 días (2), además son la unidad de reproducción asexual de SC (1).

Su pared celular se encuentra compuesta por glucanos  $\beta$  y glucopéptidos (péptidos-ramnomananos) que hacen la función de fracciones antigénicas. Estos glucopéptidos se encuentran constituidos en un 14% de proteínas y en un 86% de carbohidratos, donde los principales azúcares son la ramnosa y la manosa (2). Estos péptidos-ramnomananos se consideran como un factor importante para lograr el desarrollo de una respuesta tipo DTH, así como la respuesta basada en anticuerpos (25, 26).

Además algunos estudios realizados en ratones en donde se evaluó la virulencia de las conidias de SC, indican que las conidias cultivadas durante 4 a 7 días son mucho más virulentas que las cultivadas durante 10 a 12 días y que esta diferencia radica en cierta parte, en la composición de su pared celular, en la cual la proporción de ramnosa: manosa se modifica durante los diferentes tiempos de cultivo, siendo que la cantidad de ramnosa presente durante los primeros días de cultivo (4 a 7 días) es mayor que la cantidad de manosa, sin embargo esta proporción se invierte en los siguientes días (10 a 12 días) (9). Esto correlaciona con estudios en los que se indica que la ramnosa que forma parte de los

glucopéptidos de SC es considerada el principal epítoto antigénico presente en la pared celular de este hongo (26).

Las conidias se encuentran en el suelo y vegetación y representan la forma de entrada del hongo al hospedero. Estudios in vitro han comprobado que las conidias de SC activan a las células dendríticas (DCs) al inducir en estas células, una alta expresión de HLA-DR, moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86) y CD83 (5, 6), además de inducir una alta producción de INF- $\gamma$ , IL-12 (21) y TNF- $\alpha$  y en menor cantidad de IL-6 (4).

Como se sabe, las células dendríticas son parte importante en el desarrollo de una respuesta inmune eficaz. Por lo cual el hecho de que las conidias de SC sean capaces de activar a estas células, las convierte en un antígeno candidato a ser evaluado.

### **Células del Sistema Inmune en la piel.**

La piel y las mucosas son la primera línea de defensa en contra de agentes patógenos. En el caso de la piel, dentro de las células que se encargan de la inmunovigilancia y de desarrollar esta defensa, se encuentran las DCs las cuales se sabe son células presentadoras de antígeno profesionales (APC) y forman parte importante en los mecanismos de iniciación, polarización y control de la respuesta inmune adaptativa (39).

Dentro de las DCs de la piel podemos encontrar a las células de Langerhans (CL), población característica de la epidermis, región en donde estas células se encargan de detectar la presencia de algún patógeno o componentes derivados de este (56). De manera subyacente a la epidermis podemos encontrar a la dermis, y dentro de ésta observamos a las células dendríticas dermales (CDD), otra población de DCs, las cuales son fenotípicamente y funcionalmente diferentes a las CL. Ambas poblaciones cooperan en distintas funciones durante el inicio, desarrollo y control de la respuesta inmune (40, 41, 42).

Además tanto las CL como las CDD migran en bajas cantidades y de manera constitutiva hacia los ganglios linfáticos drenantes de la piel. Sin embargo, esta migración se incrementa bajo diversas condiciones como la inflamación. Bajo estas condiciones se pueden encontrar a las CDD en los ganglios linfáticos, durante las primeras 24 horas posteriores al inicio del daño en la piel, mientras que las CL tardan de 3 a 4 días en migrar de la epidermis a los ganglios linfáticos (58, 61), lo que les confiere ciertas diferencias en la iniciación y control de la respuesta inmune (32). Incluso algunos reportes demuestran

que la primera presentación de antígeno a las células T CD4 naive, la llevan a cabo las células dendríticas residentes de los nódulos linfáticos, las cuales presentan el antígeno que llega, de forma libre, hasta estos nódulos después de la inoculación en piel. Interesantemente esta presentación de antígeno solo desarrolla una activación transitoria de los linfocitos T, por lo cual para el desarrollo de una respuesta del tipo DTH es necesaria la subsecuente presentación de antígeno a estos linfocitos por parte de las células dendríticas de la piel (57). Esto coincide con algunos reportes en donde se utilizaron ratones a los cuales se les eliminaron las CL y demuestran que la respuesta del tipo DTH depende en gran medida para su desarrollo, de la presencia de estas células, ya que al inducir esta respuesta en las orejas de los ratones deficientes de las CL, la inflamación se ve disminuida considerablemente, sin embargo no desaparece por completo, indicando que las CDD poseen la capacidad de mediar esta respuesta cuando es necesario (40). Las DCs de la piel han sido implicadas en la iniciación y control de enfermedades autoinmunes e hipersensibilidades con manifestación cutánea. (56).

Por otra parte, la inflamación no es el único mecanismo por el cual se modifica la migración de las CL y las CDD, la utilización de ciertos adyuvantes en piel, como el LPS el cual es reconocido por el receptor tipo Toll TLR-4 y que induce una respuesta del tipo Th1 (59) o la papaína, la cual es una cistein-proteasa y que se ha visto, en estudios recientes que induce una respuesta del tipo Th2 (60), así como la toxina del cólera (TC), también modifican la migración de estas DCs de la piel hacia los ganglios linfáticos. Este efecto se ha observado en estudios en los que muestran que la movilización de las CL promueve la inducción de una respuesta del tipo Th1, mientras que la migración de las CDD de manera individual polariza hacia una respuesta del tipo Th2 (42). Lo cual tiene importantes implicaciones en el desarrollo de diversas vacunas.

Estudios realizados en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes (UIMEA) del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, indican que la inmunización en la oreja con ciertos adyuvantes como la TC y su sub-unidad  $\beta$  no tóxica (CTB), producen cambios en el fenotipo de las DCs, activándolas (aumentando la expresión de CD40 y CD86) y promoviendo que tanto las células dendríticas de la piel como las residentes de los ganglios linfáticos cooperen en el inicio de una respuesta inmune al inducir una proliferación de linfocitos CD4<sup>+</sup> en los ganglios linfáticos drenantes de la piel, además estos linfocitos participan en la inducción de una

respuesta de hipersensibilidad del tipo retardada (DTH), cuando se utilizan tanto la TC completa como la CTB (32).

Algunos otros estudios en mucosas en los que se utilizó la TC y la CTB, apoyan estos resultados, al demostrar que la capacidad de estos adyuvantes de potenciar la respuesta inmune, radica en la activación de las DCs, ya que aumentan la secreción de IL-1 $\beta$  y la expresión de los marcadores CD80 y CD86 en estas células (33). Estos marcadores han sido objeto de estudio de muchas investigaciones, en las cuales se ha estudiado el papel que pueden desempeñar estas moléculas en el desarrollo de una respuesta del tipo Th1 o Th2, ya que ciertos reportes indican que altos niveles de CD80 en las células promueven una respuesta del tipo Th1 (50), mientras que una sobre-expresión de CD86 induce una respuesta del tipo Th2 (55).

Además de todos estos cambios en el fenotipo de las células dendríticas, también se ha reportado que tanto la TC como la CTB al inocularse en piel promueven la acumulación temporal de DCs en la epidermis y la dermis que estuvieron en contacto con estos adyuvantes (29).

Existen diversas evidencias de que después de la inmunización en la piel, pueden inducirse distintos tipos de respuesta inmune utilizando distintas estrategias de inmunización (27, 28, 29, 34) ya que existen evidencias de la inducción de una respuesta del tipo Th2 después de una inmunización en la oreja del ratón removiendo el estrato corneo (28), mientras que otros estudios indican una inducción de una respuesta tipo Th1 (32, 34) e incluso también se ha reportado la polarización hacia una respuesta del tipo Th17 (27, 32, 34), todos estos resultados obtenidos al inocular diversos antígenos por esta vía.

De acuerdo con lo anterior la inmunización intradérmica en la piel y en particular en la oreja del ratón podría ofrecer ventajas importantes que permitan explotar el potencial *in situ* de las DCs de la piel en el inicio de una respuesta inmune celular ya que además de permitir la llegada del antígeno a las DCs de la piel, la administración de adyuvantes podría favorecer la activación y la migración de estas células a los ganglios linfáticos cercanos para la inducción de una respuesta inmune celular.



## **Toxina del Cólera (TC) y la sub-unidad pentamérica $\beta$ no tóxica de esta toxina (CTB).**

Existen distintos adyuvantes que pueden inducir cambios fenotípicos y funcionales en las DCs. Dentro de estos se ha descrito a la TC y a la CTB, las cuales poseen un potente efecto adyuvante en la inducción de distintos tipos de respuesta inmune *in vivo* (29, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 44, 45, 48).

Al inocularse la TC completa en conjunto con antígenos modelo en mucosas (33) se ha observado la inducción de respuesta tipo Th2. Sin embargo, se ha observado también la inducción de respuesta mixta tipo Th1/ Th2 (29) y recientemente la inducción de una respuesta tipo Th17. Después de la inoculación en la piel de la TC en combinación con antígenos modelo se ha observado también la inducción de una respuesta mixta tipo Th1/Th17 (32).

La función adyuvante de la TC se debe a su capacidad de modificar tanto el perfil de citocinas expresadas, como el fenotipo de las células presentadoras de antígeno en las cuales aumentan la expresión de los antígenos clase I y II codificados en el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés), moléculas co-estimuladoras y receptores de quimiocinas (44, 45, 49). Lo que implica un cambio en su capacidad de inducción de respuesta inmune mediada por linfocitos T (45). La TC tiene además un efecto adyuvante en la respuesta de anticuerpos contra el antígeno con el que se inocula, tanto en humanos como en roedores.

Considerando los efectos tóxicos de la TC completa (51), lo cual limita su potencial uso en vacunas en humanos, se ha evaluado también el potencial adyuvante de la CTB. A pesar de que algunos trabajos siguieren que el efecto adyuvante requiere de la TC completa, es decir de la CTB más la subunidad  $\alpha$  tóxica inductora de cAMP (CTA) (43), otros trabajos muestran evidencia experimental que indica que la CTB puede tener un efecto adyuvante similar al de la TC completa (29, 32) ya que induce una respuesta inmune basada en la producción de anticuerpos, proliferación de linfocitos T (29) y el desarrollo de una respuesta del tipo DTH en contra del antígeno que se inoculó en conjunto (32). Una diferencia importante observada al utilizar la TC y la CTB como adyuvantes es que la TC causa una fuerte inflamación local en el sitio de inoculación el cual no es observado por la inoculación de la CTB (32).

Por otra parte, también se ha descrito a la CTB como un eficiente transportador de antígenos a las DCs mecanismo por el cual puede ejercer su acción adyuvante aún en

ausencia de inflamación (29, 32, 33, 46, 47, 48, 53). De esta manera se han utilizado antígenos que se unen químicamente a la CTB (33). Esta conjugación disminuye la cantidad de antígeno requerido para que las APC activen a los linfocitos T *in vitro* (48), ya que además de aumentar la expresión de CD40 y CD86 en las DCs, se incrementa la probabilidad de que el antígeno sea tomado por las DCs y por lo tanto también mejora la eficacia en la presentación de antígeno por parte de estas células (48).

Estudios realizados con la CTB en mucosas, a la cual se le conjugó químicamente un antígeno modelo como la ovoalbúmina, muestran una respuesta eficiente mediada por linfocitos B y linfocitos T del tipo Th2 (33). Por otra parte la inoculación en piel de la CTB con ovoalbúmina indica una respuesta mixta tipo Th1/Th17 (32). Y al inocular en conjunto en la piel ovoalbúmina con la CTB y la CTA se observó una respuesta mixta Th1/Th2 (29). Los distintos tipos de respuesta observada después de la inoculación de distintos antígenos en combinación con la TC y la CTB pueden estar influenciados por la ruta de inoculación, la dosis de antígeno y del adyuvante así como del tipo de DCs que se activa y captura al antígeno para su posterior presentación al linfocito T (38).

Aunque el mecanismo por el cual actúa la TC aún no está totalmente elucidado, ciertas investigaciones indican que esta toxina interactúa a través de la unión de la CTB con el gangliósido GM1, presente en la membrana celular de la mayoría de las células del cuerpo, incluyendo a los leucocitos y las DCs (31), mecanismo crítico y esencial que podría facilitar la llegada de las diferentes moléculas asociadas a estos adyuvantes (TC y CTB) a las DCs para su posterior transporte a los nódulos linfáticos cercanos al sitio de inoculación (54). Por otra parte se ha propuesto que el papel adyuvante de la TC radica en la CTA a través de la generación de cAMP (43).

Finalmente aunque es claro el efecto adyuvante de la TC en la inducción de una respuesta inmune celular algunas evidencias experimentales han propuesto que la CTB puede inducir tolerancia inmunológica a los antígenos con los cuales se co-administra (53), ya que se ha utilizado para suprimir enfermedades autoinmunes (46) y reacciones alérgicas mediadas por inmunoglobulina E (IgE) (47), pues se ha visto que al inocular ciertos antígenos en conjunto con la CTB en piel, se inhibe la respuesta basada en estos anticuerpos (29). Como se mencionó anteriormente, los distintos tipos de respuesta observada después de la inoculación de distintos antígenos en combinación con la TC y la CTB pueden estar influenciados por diversos factores como la ruta de inoculación, la dosis

de antígeno y del adyuvante así como del tipo de DCs que se activa y captura al antígeno para su posterior presentación al linfocito T (38, 29, 52).

## **JUSTIFICACION**

Estudios previos realizados en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes (UIMEA) del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, demostraron que la inoculación intradérmica (i.d) en la oreja del ratón tanto de la TC completa como de la CTB en combinación con antígenos modelo promueven la inducción de una respuesta mixta tipo Th1/Th17 por parte de los linfocitos CD4<sup>+</sup> dependiente de la migración de células dendríticas que se traduce en la inducción de una respuesta de hipersensibilidad retardada en la que participan tanto el INF- $\gamma$  como la IL-17 (32). Considerando que este tipo de respuesta puede ser importante en la protección contra patógenos extracelulares que penetran por la piel (30) en este trabajo se decidió evaluar la inducción de una respuesta celular después de la inoculación i.d en la oreja, de la TC y la CTB en conjunto con la esporotricina y las conidias inactivadas de SC, para determinar en un futuro, si esta respuesta es capaz de proteger contra la infección por este hongo cuya vía de entrada es la piel.

## **OBJETIVO.**

Evaluar la inducción de una respuesta inmune celular después de la inmunización en piel utilizando antígenos de SC solos o en conjunto con la toxina de cólera y su sub-unidad  $\beta$  no tóxica como adyuvantes.

## **HIPÓTESIS.**

La inmunización en la piel de antígenos de SC (esporotricina y conidias inactivadas) en combinación con la toxina de cólera y su sub-unidad  $\beta$  no tóxica como adyuvantes inducirá una respuesta inmune celular.

## **METODOLOGÍA.**

### **Hongo.**

Se utilizó la cepa EH-143 del hongo *Sporothrix schenckii* proporcionada por el Laboratorio de Micología básica, del Departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), donde obtuvieron esta cepa de lesiones de pacientes con esporotricosis cutáneo-linfática.

Este hongo se cultivo en agar papa-dextrosa a una temperatura de 28°C para favorecer el crecimiento de su forma micelial (hifa y conidias). Después de 4 días de cultivo, se procedió a inactivar el hongo por medio de calor. Para esto se colectó la mayor cantidad posible del hongo en un tubo con PBS y se sometió a inactivación por incubación durante 2 horas a 60°C en baño de agua. El PBS con el hongo inactivado se filtró a través de papel filtro whatman del número 1, con la finalidad de eliminar todas las hifas presentes y quedarnos solamente con las conidias. Se realizaron varios lavados hasta verificar, por observación microscópica, que se hubieran eliminado todas las hifas y solo se conservaran las conidias.

Se tomó una alícuota del filtrado final y con la ayuda de un asa estéril se resembró en agar papa-dextrosa y se puso en cultivo durante 7 días a 28°C, para verificar la inactivación de las conidias, mediante la ausencia de crecimiento en el medio de cultivo.

El resto del filtrado se centrifugó y resuspendió en 10 mL de PBS. Se realizó un conteo de las conidias con ayuda de una cámara de Neubauer y se llevó a una

concentración final de  $5 \times 10^4$  conidias/20 $\mu$ L. Este filtrado se almacenó a una temperatura de -80°C hasta su uso.

### **Esporotricina.**

La esporotricina fue proporcionada por el Laboratorio de Micología básica, del Departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Esta se obtuvo de cultivos del hongo *Sporothrix schenckii* durante la fase micelial y se encontraba a una concentración de 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ L.

### **Anticuerpos y reactivos.**

Los anticuerpos se adquirieron con la empresa Pharmigen-BD Biosciences (San José, CA, EUA). La CTB se adquirió con la empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) y la TC fue adquirida con la empresa Calbiochem (Merck, Darmstadt, Alemania). En tanto que la Dispasa II se compró con la empresa Roche Biochemicals (Indianápolis, IN, EUA).

### **Ratones.**

Para este trabajo se utilizaron ratones C57BL/6 proporcionados por el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, ubicada en el Hospital General de México.

Los cuidados de los animales en este bioterio cumplen con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana del cuidado de animales NOM-062-ZOO-1999. Los procedimientos de inoculación así como el sacrificio de los ratones se realizaron de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. La inoculación de fluidos y sustancias se realizó de acuerdo al inciso 8.2 de esta norma en la que se especifican las vías de inoculación permitidas para ratones. El sacrificio de los ratones se llevó a cabo de acuerdo al inciso 9.1 de la Norma Oficial Mexicana antes mencionada, con el propósito de eliminar o disminuir al mínimo el dolor y el estrés previo y durante el procedimiento. El método con bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) descrito en el inciso 9.4.1.3 de esta norma fue el utilizado durante este trabajo.

### **Respuesta tipo DTH y tinción de linfocitos.**

Las orejas de ratones C57BL/6 se inocularon de manera intradérmica con PBS (20  $\mu$ L), esporotricina (2  $\mu$ g) (fracción glucoproteica obtenida de la fase micelial o filamentosa del hongo SC), TC (1  $\mu$ g) de manera individual, CTB (2  $\mu$ g) sola, esporotricina (2  $\mu$ g) en conjunto con la TC (1  $\mu$ g) o la CTB (2  $\mu$ g), conidias inactivadas del hongo SC ( $5 \times 10^4$  conidias inactivadas) y conidias inactivadas ( $5 \times 10^4$  conidias inactivadas) en conjunto con la TC (1  $\mu$ g) o la CTB (2  $\mu$ g).

Después de 7 o 31 días de la primera inoculación, se realizó el reto correspondiente en cada una de las orejas sensibilizadas, mediante la inoculación intradérmica con PBS (20  $\mu$ L), esporotricina (2  $\mu$ g) y conidias inactivadas ( $5 \times 10^4$  conidias inactivadas), de acuerdo al antígeno con el cual fueron sensibilizadas las orejas inicialmente. Además se midió la inflamación existente en las orejas de los ratones 24 horas antes del reto y 24 y 48 horas posteriores al reto. La medición de la inflamación en las orejas de los ratones, se realizó utilizando un micrómetro electrónico digital, para medición de exteriores con un rango de medición de 0 a 25.4 mm y una resolución de 0.001 mm.

Posterior a la medición de las 48 horas, se sacrificó a los ratones y se removieron las orejas. La epidermis se separó de la dermis mediante un tratamiento enzimático con Dispasa II (1mg/mL) durante 12 h. La epidermis se puso en cultivo durante 72 horas en medio de cultivo para permitir la movilización de las células de la piel al medio de cultivo. Después de este tiempo se colectaron las células en suspensión. Las células colectadas se sometieron a una tinción para observar la expresión de los marcadores CD4 y CD44. Estas células fueron analizadas usando el citómetro de flujo FACSAria (BD Biosciences). Los resultados se analizaron usando el programa FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

## RESULTADOS.

Inicialmente se evaluó si después de la inmunización intradérmica (i.d) en la oreja del ratón con conidias del hongo *Sporothrix schenckii* (SC) inactivadas por calor, se lograba la inducción de una respuesta inmune celular al reto contra las mismas conidias en la oreja. Esto se evaluó mediante la aparición de una reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) la cual se determina por la inflamación en la oreja después del reto con el antígeno.

Para evaluar si la respuesta inducida era local o sistémica, se inoculó las conidias inactivadas de SC, en conjunto con la TC completa en una de las orejas de los ratones C57BL/6 y se realizó el reto correspondiente con las conidias inactivadas, a los 7 días de la inoculación, en ambas orejas del ratón.

Como se puede observar en la figura 1, en la oreja sensibilizada inicialmente con la TC en conjunto con las conidias y retada a los 7 días con las conidias se desarrolló una respuesta del tipo DTH a las 24 horas posteriores al reto. Mientras que, en la oreja que inicialmente solo se inoculó PBS y recibió el reto con las conidias a los 7 días, esta respuesta no se desarrolló.

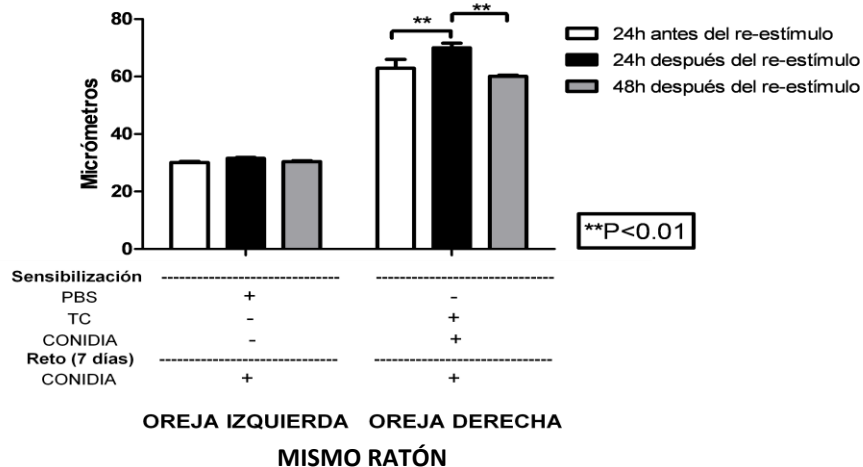


Figura 1.- Respuesta del tipo DTH en la oreja del ratón utilizando las conidias inactivadas de SC y a la TC como adyuvante. Se inoculó en las orejas de manera intradérmica (i. d.) a ratones C57BL/6 con diferentes antígenos. La oreja izquierda se inyectó con PBS (20  $\mu$ L), mientras que en la oreja derecha se sensibilizó con TC (1  $\mu$ g) en conjunto con las conidias inactivadas de SC ( $5 \times 10^4$  conidias). Después de 7 días de la sensibilización se realizó el reto o re-estímulo en ambas orejas mediante la inoculación i. d. de las conidias inactivadas ( $5 \times 10^4$  conidias). Se midió la inflamación de las orejas 24 horas antes del reto y 24 y 48 horas posteriores al reto. La gráfica muestra la media más la SD de por lo menos dos experimentos independientes con dos ratones por grupo. Para el análisis estadístico se desarrolló una ANOVA de dos vías con una post-prueba de Bonferroni; \*\*p<0.01.

Una vez observado que la respuesta desarrollada utilizando esta técnica de inoculación de antígeno en combinación con la TC parecía ser local, se decidió realizar el resto de los experimentos sensibilizando y retando en la misma oreja.

Posteriormente se evaluó la inducción de una DTH en contra de las conidias inactivadas del hongo SC, de manera individual y en conjunto con la TC. Ambas condiciones comparadas con sus respectivos controles (PBS retado con PBS y TC retado con conidias), evaluando los resultados mediante la aparición o ausencia de una respuesta del tipo DTH.

Como se puede observar en la figura 2 la inmunización con las conidias solas no induce una reacción de DTH ya que al retar nuevamente con las conidias se observa una ligera inflamación en la oreja, sin embargo esta no es significativa. Por el contrario la inmunización con las conidias en combinación con la toxina de cólera induce una reacción de DTH al reto con las conidias en ausencia de adyuvante. Sin embargo esta inflamación no se mantiene a las 48 horas posteriores al reto.

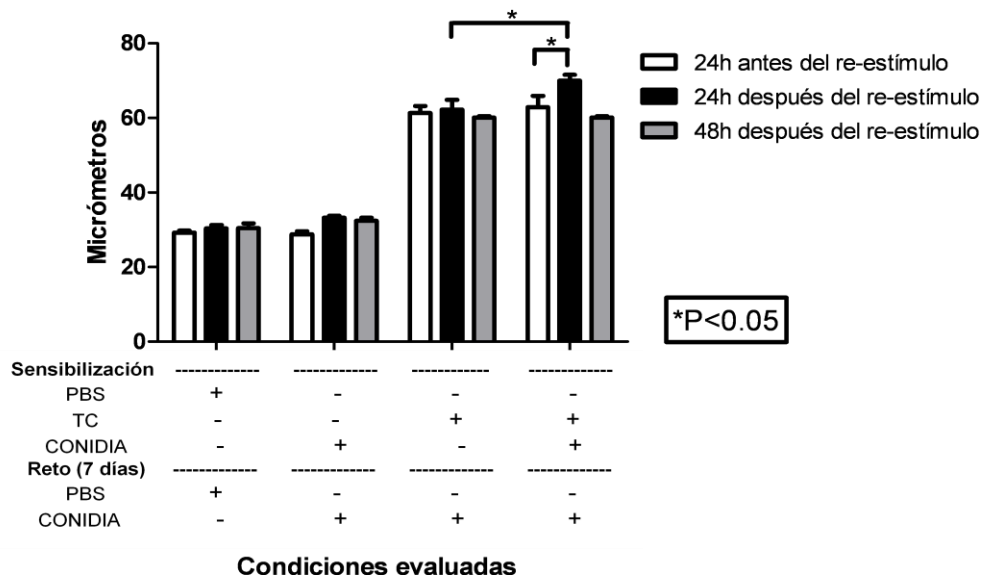


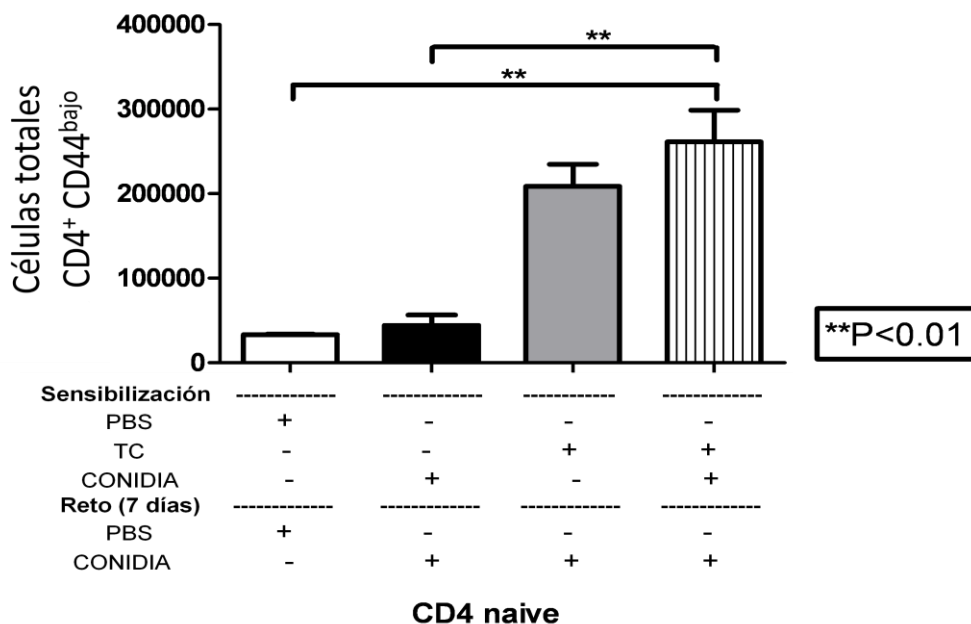
Figura 2.- Respuesta del tipo DTH en las orejas de los ratones, utilizando las conidias inactivadas de SC y a la TC como adyuvante. Se inoculó en las orejas de manera i. d. a ratones C57BL/6 con PBS (20  $\mu$ L), conidias inactivadas ( $5 \times 10^4$  conidias), TC (1  $\mu$ g) y conidias inactivadas ( $5 \times 10^4$ ) en conjunto con la TC (1  $\mu$ g). Después de 7 días de la sensibilización se realizó el reto o re-estímulo en la misma oreja que fue sensibilizada mediante la inoculación i. d. de PBS (20  $\mu$ L) y conidias inactivadas ( $5 \times 10^4$  conidias) en el orden mostrado en la gráfica. Se midió la inflamación de las orejas 24 horas antes del reto y 24 y 48 horas posteriores al reto. La gráfica muestra la media más la SD de por lo menos dos experimentos independientes con dos ratones por grupo. Para el análisis estadístico se desarrolló una ANOVA de dos vías con una post-prueba de Bonferroni; \* $p < 0.05$ .



Posterior a la prueba de DTH, se obtuvo la epidermis de las orejas de los ratones y se pusieron en cultivo para obtener las células que se movilizan de la piel al medio de cultivo. Una vez colectadas estas células, se les realizó una tinción para observar la presencia de linfocitos CD4<sup>+</sup> con fenotipo “naive” y de memoria evaluando la expresión de CD44. (Figura 3 A y B). En la figura 3A se observa un incremento en el número total de linfocitos T CD4 con fenotipo naive (CD4<sup>+</sup> CD44<sup>bajo</sup>) en la epidermis de los ratones que fueron inoculados con las conidias en combinación con la TC comparado con los ratones que fueron inoculados con PBS o con las conidias en ausencia de adyuvante. Sin embargo, este incremento se observa también en los ratones que fueron inoculados solamente con la TC lo que indica que la inoculación de la TC por si sola induce la llegada de linfocitos T CD4 con fenotipo naive al sitio de inoculación.

Resultados similares se observan al evaluar la presencia de linfocitos T CD4 con fenotipo de memoria (CD4<sup>+</sup> CD44<sup>alto</sup>) en la epidermis de la oreja de los ratones. Sin embargo en este caso no se observa ninguna diferencia estadística entre las cuatro condiciones evaluadas (Figura 3B).

A)



B)

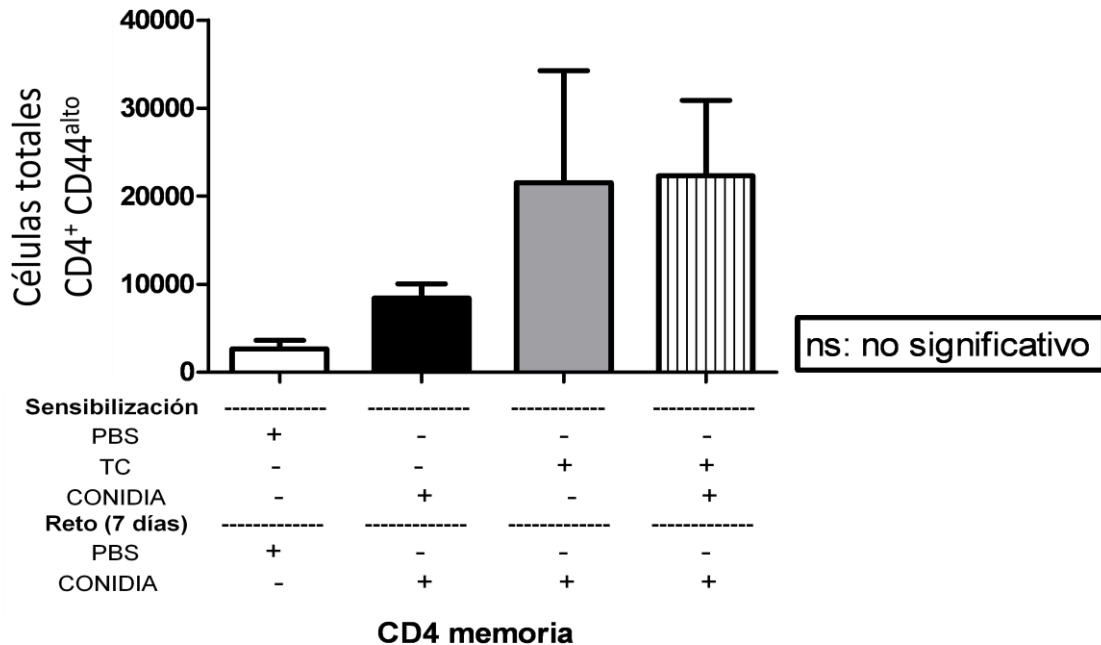


Figura 3.- Presencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> “naive” (CD4<sup>+</sup>, CD44<sup>bajo</sup>) y de memoria (CD4<sup>+</sup>, CD44<sup>alto</sup>) en la epidermis de las orejas de los ratones evaluados en la DTH en la que se utilizó las conidias inactivadas y a la TC como adyuvante. Transcurridas 48 horas posteriores al reto realizado durante la prueba de DTH, se obtuvo la epidermis de las orejas de los ratones, de cada una de las condiciones evaluadas y se cultivaron durante 72 horas para obtener las células que se movilizan de la piel al medio de cultivo. Una vez colectadas estas células, se realizó una tinción para observar la presencia de linfocitos CD4 “naive” (A) y con fenotipo de memoria (B) evaluando la expresión de CD44. Las gráficas muestran la media más la SD de por lo menos dos experimentos independientes con dos ratones por grupo. Para el análisis estadístico se desarrolló una ANOVA de una vía con una post-prueba de Bonferroni; \*\*p<0.01.

Los resultados de la DTH muestran que la inoculación i.d de la TC induce una inflamación importante que impide que se observe de manera clara la inflamación causada por la inmunización de las conidias en combinación con la TC y el reto posterior con las conidias. De acuerdo con esto se realizaron nuevos experimentos en los que se dejaron transcurrir 26 días después de la primera inoculación, con el objetivo de que la inflamación inicial provocada por la TC disminuyera y así poder evaluar de una mejor manera la respuesta que se pudiera desarrollar contra las conidias, tanto en la reacción de DTH (Figura 4), como en la presencia de infiltrado de linfocitos en la epidermis de las orejas de los ratones. (Figura 5 A y B)

Como se observa en la Figura 4 después de casi un mes de la inmunización se logra disminuir aunque no a los niveles basales, la inflamación inicial causada por la TC y nuevamente se observa una reacción de DTH al reto con las conidias indicando que la inmunización con las conidias y la TC induce una respuesta celular sostenida en el tiempo.

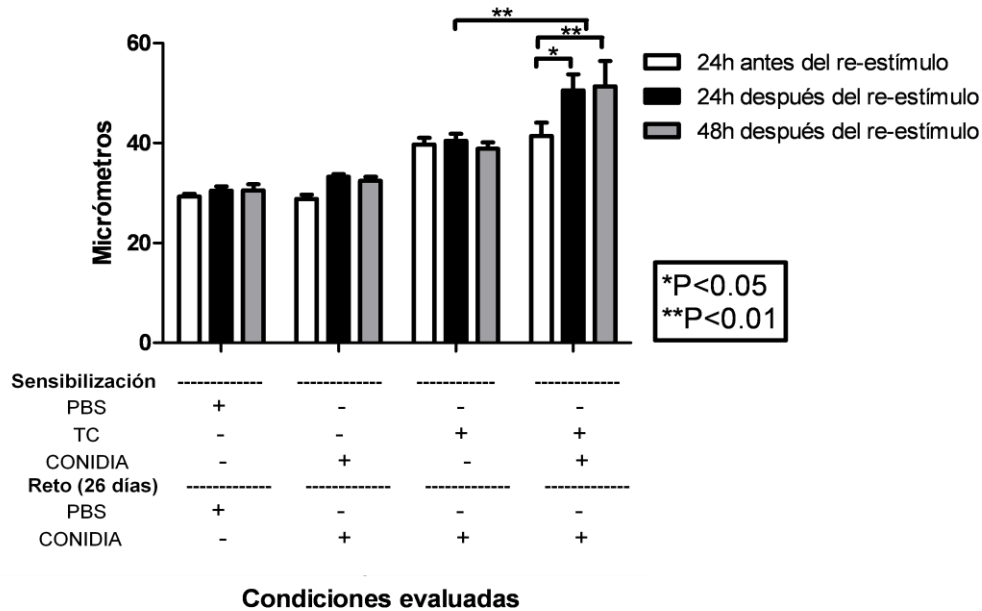
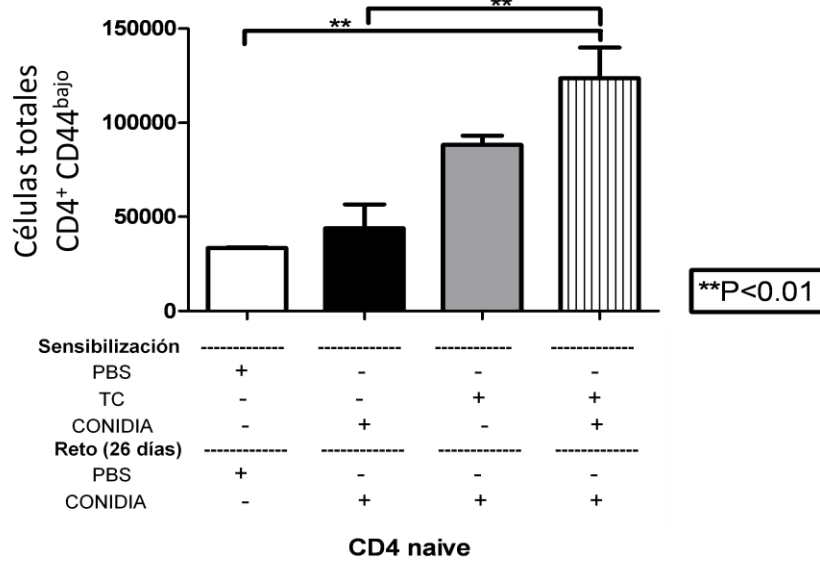


Figura 4.- Respuesta del tipo DTH en las orejas de los ratones, utilizando las conidias inactivadas de SC y a la TC como adyuvante. Se inoculó en las orejas de manera i. d. a ratones C57BL/6 con PBS (20  $\mu$ L), conidias inactivadas ( $5 \times 10^4$  conidias), TC (1  $\mu$ g) y conidias inactivadas ( $5 \times 10^4$ ) en conjunto con la TC (1  $\mu$ g). Después de 26 días de la sensibilización se realizó el reto o re-estímulo en la misma oreja que fue sensibilizada mediante la inoculación i. d. de PBS (20  $\mu$ L) y conidias inactivadas ( $5 \times 10^4$  conidias) en el orden mostrado en la gráfica. Se midió la inflamación de las orejas 24 horas antes del reto y 24 y 48 horas posteriores al reto. La gráfica muestra la media más la SD de por lo menos dos experimentos independientes con dos ratones por grupo. Para el análisis estadístico se desarrolló una ANOVA de dos vías con una post-prueba de Bonferroni; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Al evaluar la presencia de linfocitos T CD4 tanto con fenotipo naive como de memoria después de 26 días de la primera inmunización, se observa que los números de linfocitos T CD4 “naive” se mantienen incrementados por la inoculación inicial con la TC y no son significativamente diferentes a los números obtenidos en las orejas de los ratones inoculados con las conidias en combinación con la TC y retados con las conidias. En contraste los números de los linfocitos T CD4 con fenotipo de memoria, si son diferentes en los ratones inoculados con la TC y retados con las conidias, comparados con los ratones inmunizados con las conidias en combinación con la TC y retados con las conidias. (Figuras 5 A y B)

A)



B)

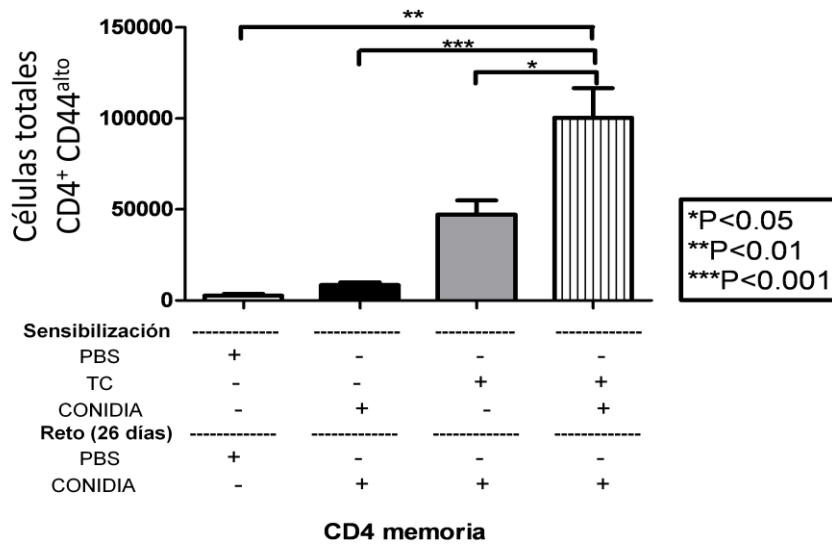


Figura 5.- Presencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la epidermis de las orejas de los ratones evaluados en la DTH, en la que se utilizó las conidias inactivadas y a la TC como adyuvante y cuyo reto se realizó a los 26 días posteriores a la sensibilización. Transcurridas 48 horas posteriores al reto realizado durante la prueba de DTH, se obtuvo la epidermis de las orejas de los ratones, de cada una de las condiciones evaluadas y se cultivaron durante 72 horas para obtener las células que se movilizan de la piel al medio de cultivo. Una vez colectadas estas células, se realizó una tinción para observar la presencia de linfocitos CD4 “naive” (A) y con fenotipo de memoria (B). Las gráficas muestran la media más la SD de por lo menos dos experimentos independientes con dos ratones por grupo. Para el análisis estadístico se desarrolló una ANOVA de una vía con una post-prueba de Bonferroni; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

Una vez observado que se logra desarrollar una respuesta inmune celular contra las conidias utilizando la TC como adyuvante, se decidió probar si esta respuesta podría repetirse en contra de otro antígeno potencial del hongo *Sporothrix schenckii* (SC) como lo es la esporotricina (SPO).

Por lo cual se repitió el experimento anterior (DTH con el reto a los 26 días) y se evaluó además la presencia de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> presentes en la epidermis de las orejas de los ratones, pero en esta ocasión se utilizó la esporotricina como antígeno a evaluar. (Figura 6 y Figura 7)

Como se puede observar en la figura 6 la oreja inoculada inicialmente con la TC en conjunto con la esporotricina y retada a los 26 días con la esporotricina, desarrolla una respuesta del tipo DTH, evidenciada por la presencia de inflamación a las 24 horas posteriores al reto. Sin embargo esta inflamación se pierde a las 48 horas posteriores al reto.

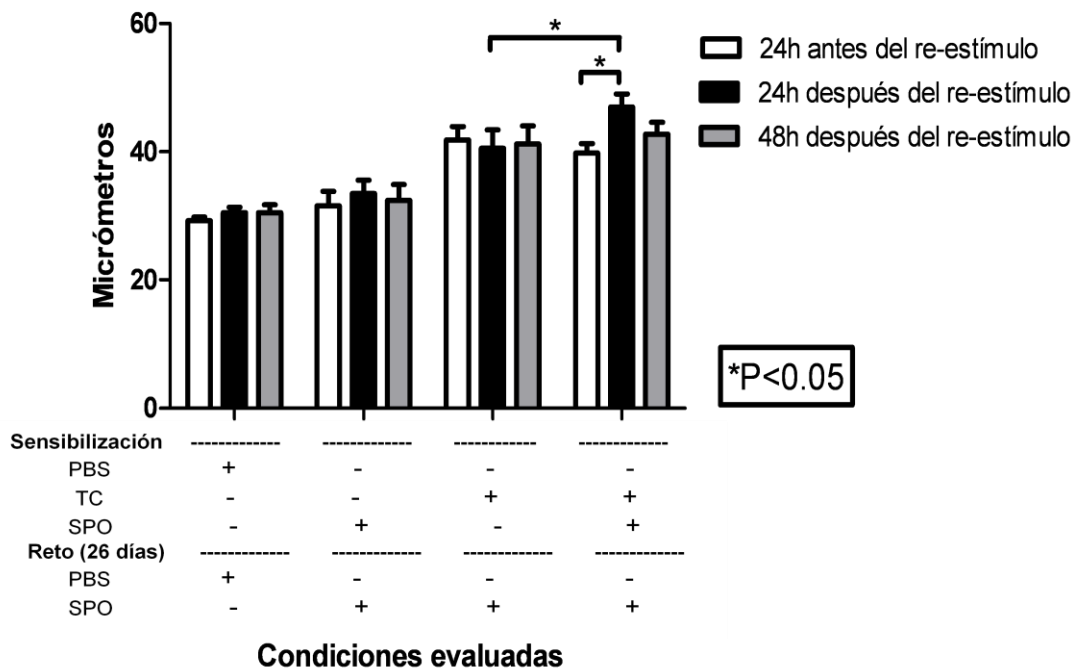
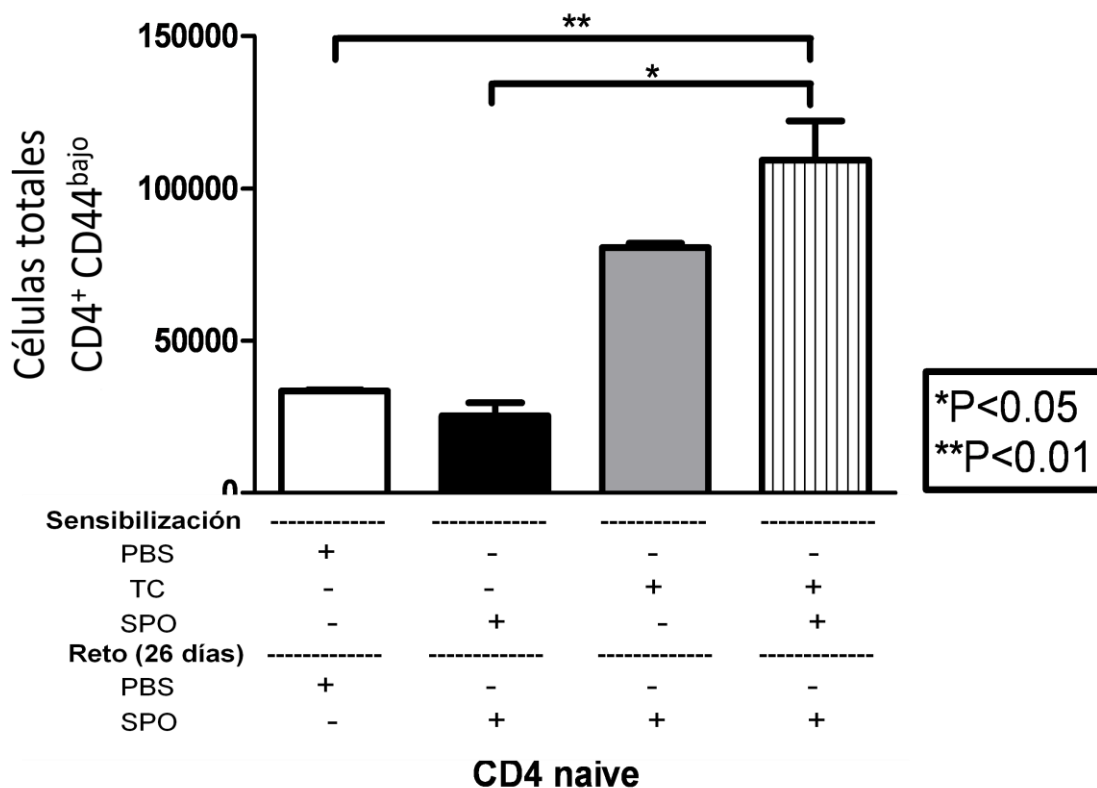


Figura 6.- Respuesta del tipo DTH en las orejas de los ratones, utilizando la esporotricina (SPO) del hongo SC y a la TC como adyuvante. Se inoculó en las orejas de manera i. d. a ratones C57BL/6 con PBS (20  $\mu$ L), esporotricina (2  $\mu$ g), TC (1  $\mu$ g) y esporotricina (2  $\mu$ g) en conjunto con la TC (1  $\mu$ g). Después de 26 días de la sensibilización se realizó el reto o re-estímulo en la misma oreja que fue sensibilizada mediante la inoculación i. d. de PBS (20  $\mu$ L) y esporotricina (2  $\mu$ g) en el orden mostrado en la gráfica. Se midió la inflamación de las orejas 24 horas antes del reto y 24 y 48 horas posteriores al reto. La gráfica muestra la media más la SD de por lo menos dos experimentos independientes con dos ratones por grupo. Para el análisis estadístico se desarrolló una ANOVA de dos vías con una post-prueba de Bonferroni; \*p<0.05.

Mientras que en la figura 7 se observa que la epidermis de la oreja inoculada con la TC más la esporotricina y retada a los 26 días con la esporotricina presenta mayor cantidad de linfocitos CD4 con fenotipo naive que el resto de las condiciones evaluadas, sin embargo este aumento solo es estadísticamente significativo con respecto a los controles de PBS retado con PBS y esporotricina retado con esporotricina (Figura 7 A). Por otra parte la oreja sensibilizada únicamente con la TC y retada a los 26 días con la esporotricina, presenta un aumento importante y estadísticamente significativo de linfocitos T CD4 con fenotipo de memoria que infiltran en la epidermis de esta oreja (Figura 7 B).

A)



B)

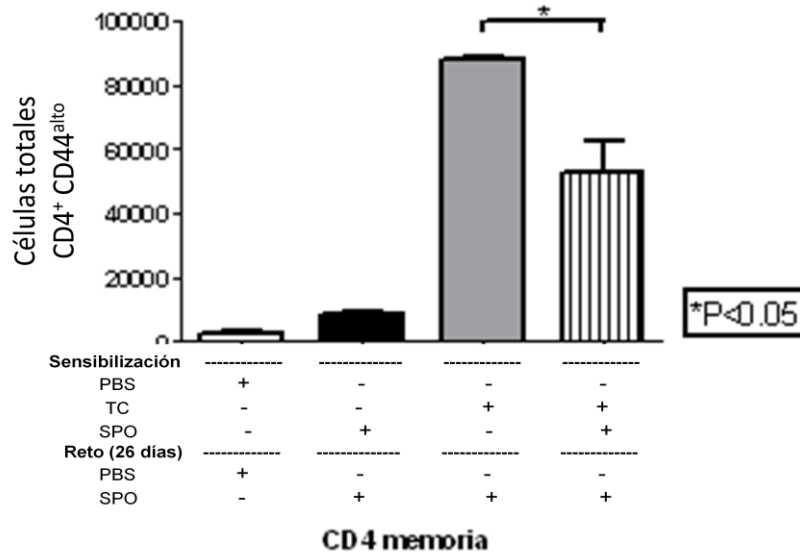


Figura 7.- Presencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la epidermis de las orejas de los ratones evaluados en la DTH, en la que se utilizó la esporotricina y a la TC como adyuvante y cuyo reto se realizó a los 26 días posteriores a la sensibilización. Transcurridas 48 horas posteriores al reto realizado durante la prueba de DTH, se obtuvo la epidermis de las orejas de los ratones, de cada una de las condiciones evaluadas y se cultivaron durante 72 horas para obtener las células que se movilizan de la piel al medio de cultivo. Una vez colectadas estas células, se realizó una tinción para observar la presencia de linfocitos CD4 “naive” (A) y con fenotipo de memoria (B). Las gráficas muestran la media más la SD de por lo menos dos experimentos independientes con dos ratones por grupo. Para el análisis estadístico se desarrolló una ANOVA de una vía con una post-prueba de Bonferroni; \*p<0.05, \*\*p<0.01.

Los resultados anteriores muestran que ni las conidias ni la esporotricina, a las concentraciones en las que se les utilizó, son capaces de inducir por si solas una respuesta inmune celular. Muestran además que la TC es un adyuvante potencial capaz de desarrollar una respuesta inmune celular después de la inmunización i.d en la oreja del ratón al inocularse en conjunto con las conidias y en menor grado con la esporotricina.

De esta manera, considerando los efectos tóxicos de la TC completa y basados en estudios anteriores realizados en la UIMEA del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, se decidió probar si la sub-unidad  $\beta$  no tóxica de la TC (CTB) podría ser un adyuvante después de la inoculación i.d en la piel de las conidias y la esporotricina.

Para probar la capacidad adyuvante de la CTB, se repitieron los experimentos de DTH realizando el reto a los 7 días ya que la inoculación de la CTB no causa una

inflamación aparente en la oreja. Se evaluó además la presencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la epidermis de las orejas de los ratones.

Como se puede notar en la figura 8, no se obtuvo una reacción de DTH en la oreja del ratón inoculada inicialmente con la esporotricina y la CTB en conjunto y retada a los 7 días con la esporotricina. En cuanto a la presencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> presentes en la epidermis se encontró que la epidermis de la oreja inoculada con la CTB y retada a los 7 días con la esporotricina presenta mayor cantidad de linfocitos CD4 naive que el resto de las condiciones evaluadas, sin embargo este aumento solo es estadísticamente diferente con respecto al control de esporotricina retado con esporotricina (Figura 9 A). En el caso de los linfocitos CD4 de memoria, se observa que la epidermis de la oreja inoculada inicialmente con la CTB en combinación con la esporotricina y retada con esporotricina, presenta mayor cantidad de estas células, sin embargo esta diferencia solo es estadísticamente significativa respecto al control de PBS. (Figura 9 B)

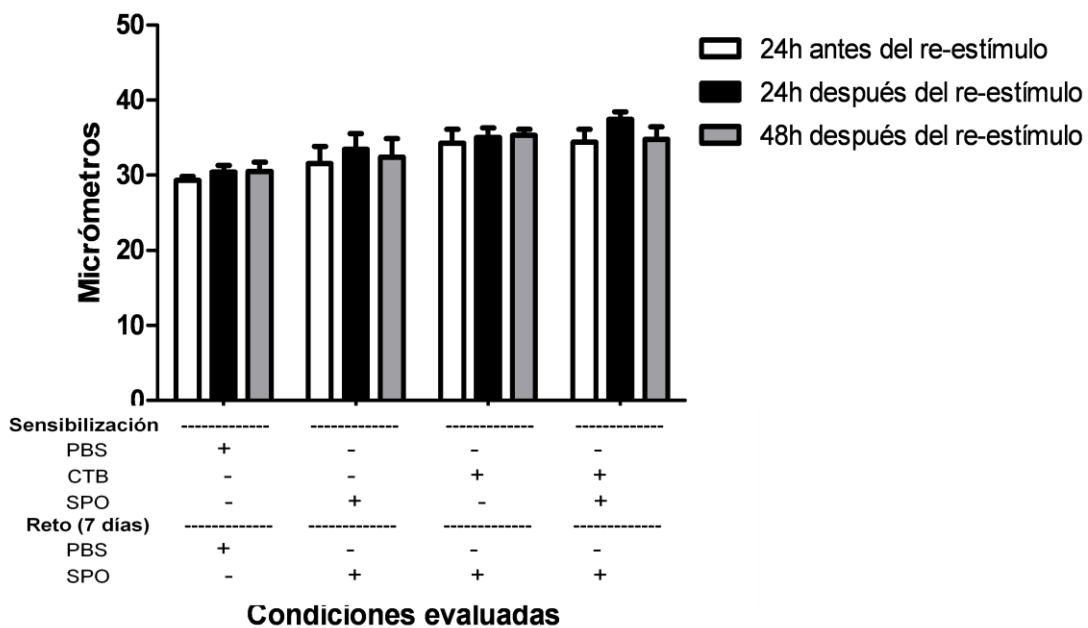
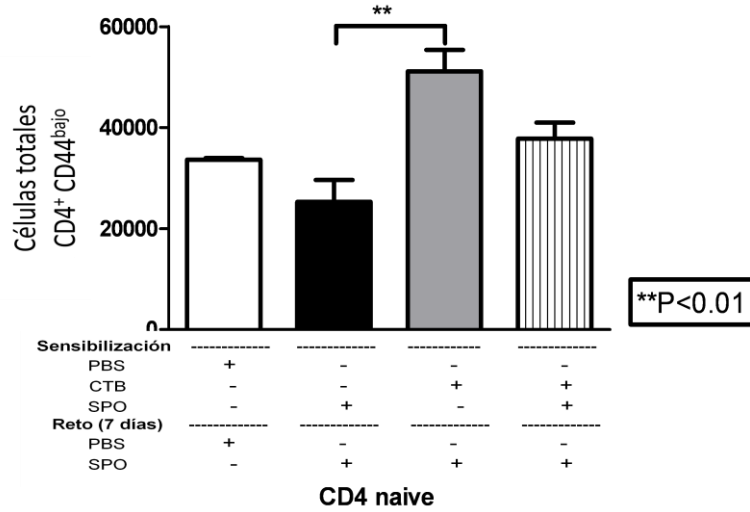


Figura 8.- Respuesta del tipo DTH en las orejas de los ratones, utilizando la esporotricina (SPO) del hongo SC y a la sub-unidad  $\beta$  no tóxica de la toxina del cólera (CTB) como adyuvante. Se inoculó en las orejas de manera i. d. a ratones C57BL/6 con PBS (20  $\mu$ L), esporotricina (2  $\mu$ g), CTB (2  $\mu$ g) y esporotricina (2 $\mu$ g) en conjunto con la CTB (2  $\mu$ g). Después de 7 días de la sensibilización se realizó el reto o re-estimulo en la misma oreja que fue sensibilizada mediante la inoculación i. d. de PBS (20  $\mu$ L) y esporotricina (2  $\mu$ g) en el orden mostrado en la gráfica. Se midió la inflamación de las orejas 24 horas antes del reto y 24 y 48 horas posteriores al reto. La gráfica muestra la media más la SD de por lo menos dos experimentos independientes con dos ratones por grupo. Para el análisis estadístico se desarrolló una ANOVA de dos vías con una post-prueba de Bonferroni. No existen diferencias estadísticamente significativas.



A)



B)

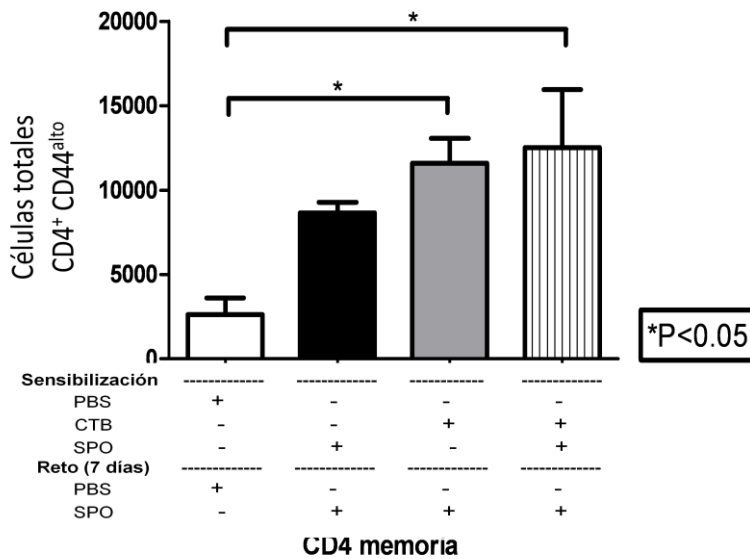


Figura 9.- Presencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> “naive” y de memoria en la epidermis de las orejas de los ratones evaluados durante la DTH, en la que se utilizó la esporotricina y a la CTB como adyuvante. Transcurridas 48 horas posteriores al reto realizado durante la prueba de DTH, se obtuvo la epidermis de las orejas de los ratones, de cada una de las condiciones evaluadas y se cultivaron durante 72 horas para obtener las células que se movilizan de la piel al medio de cultivo. Una vez colectadas estas células, se realizó una tinción para observar la presencia de linfocitos CD4 “naive” (A) y con fenotipo de memoria (B). Las gráficas muestran la media más la SD de por lo menos dos experimentos independientes con dos ratones por grupo. Para el análisis estadístico se desarrolló una ANOVA de una vía con una post-prueba de Bonferroni; \*p<0.05, \*\*p<0.01.

De manera interesante al evaluar la reacción de DTH después de la inoculación de las conidias en combinación con la CTB, se observa que la oreja inoculada inicialmente con la CTB en conjunto con las conidias y retada a los 7 días con las conidias, desarrolló una respuesta del tipo DTH, evidenciada por la presencia de inflamación en la oreja tanto a las 24 horas como a las 48 horas posteriores al reto. (Figura 10)

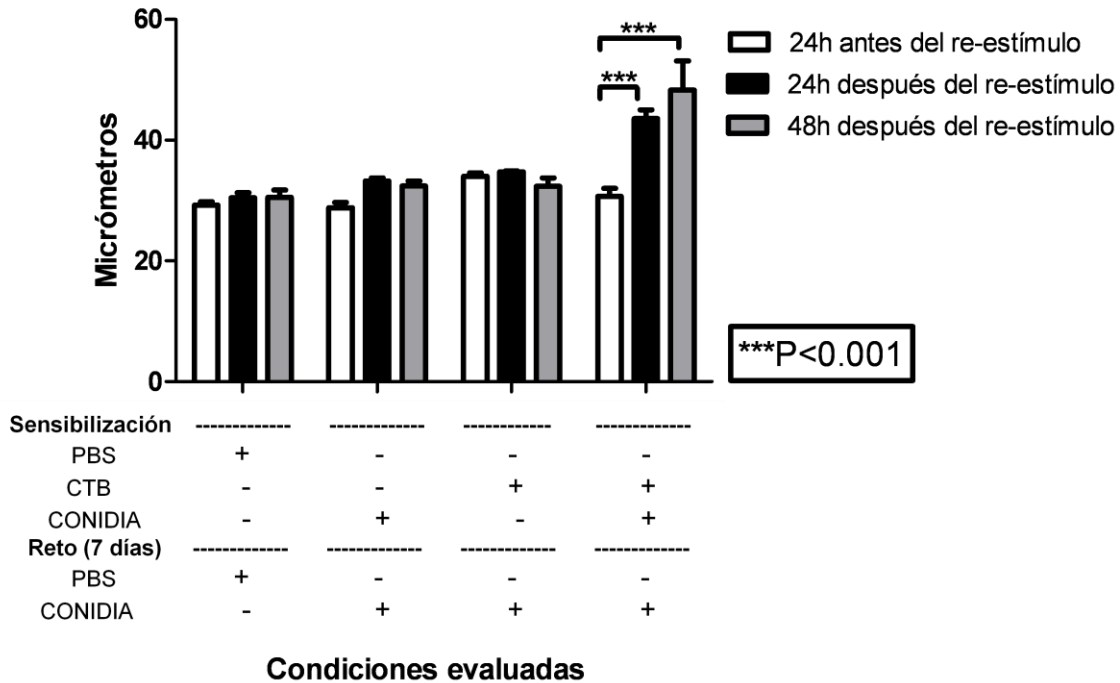
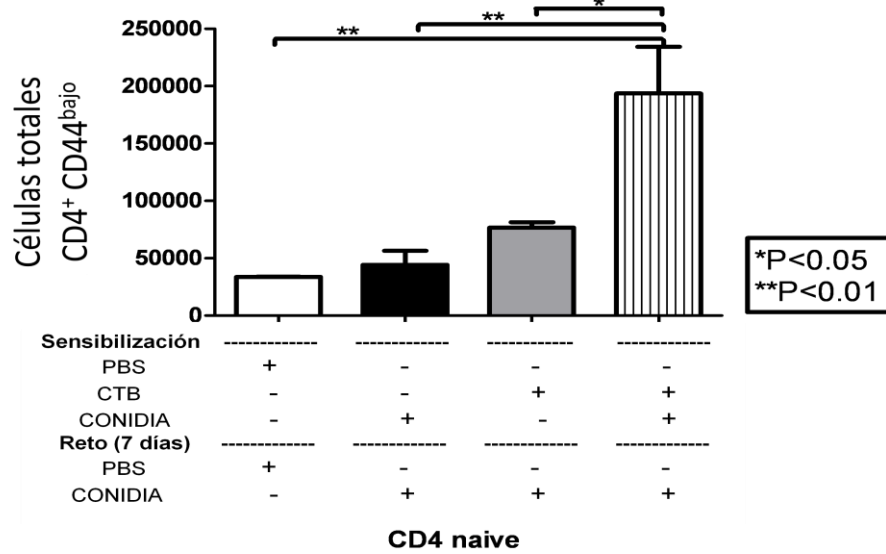


Figura 10.- Respuesta del tipo DTH en las orejas de los ratones, utilizando las conidias inactivadas de SC y a la sub-unidad  $\beta$  no tóxica de la toxina del cólera (CTB) como adyuvante. Se inoculó en las orejas de manera i. d. a ratones C57BL/6 con PBS (20  $\mu$ L), conidias inactivadas ( $5 \times 10^4$  conidias), CTB (2  $\mu$ g) y conidias inactivadas ( $5 \times 10^4$  conidias) en conjunto con la CTB (2  $\mu$ g). Después de 7 días de la sensibilización se realizó el reto o re-estímulo en la misma oreja que fue sensibilizada mediante la inoculación i. d. de PBS (20  $\mu$ L) y conidias inactivadas ( $5 \times 10^4$  conidias) en el orden mostrado en la gráfica. Se midió la inflamación de las orejas 24 horas antes del reto y 24 y 48 horas posteriores al reto. La gráfica muestra la media más la SD de por lo menos dos experimentos independientes con dos ratones por grupo. Para el análisis estadístico se desarrolló una ANOVA de dos vías con una post-prueba de Bonferroni; \*\*\* $p < 0.001$ .

En cuanto a la presencia de linfocitos T CD4 naive y de memoria se observa que la epidermis de la oreja inoculada inicialmente con la CTB más las conidias y retada a los 7 días con las conidias presenta una mayor cantidad de linfocitos CD4 naive y CD4 de memoria comparada con el resto de las condiciones evaluadas, además de que este aumento es estadísticamente significativo. (Figura 11 A y B)

A)



B)

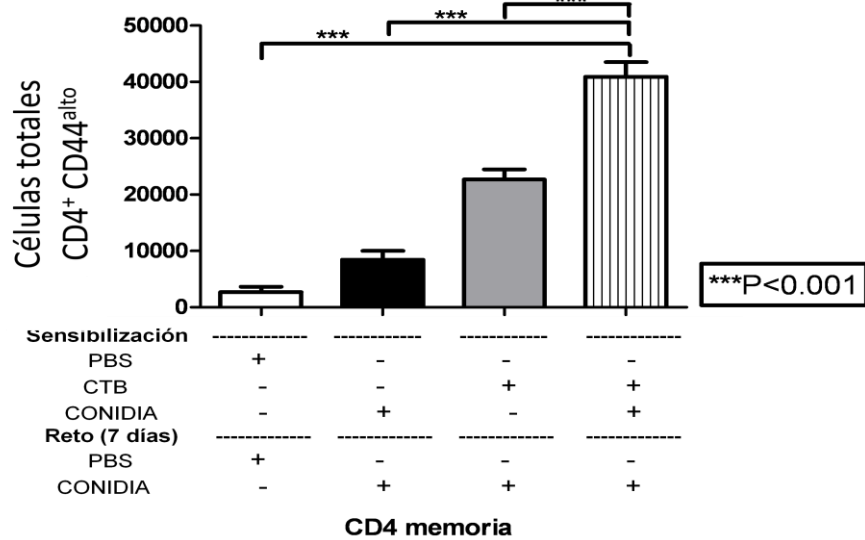


Figura 11.- Presencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la epidermis de las orejas de los ratones evaluados en la DTH, en la que se utilizó las conidias inactivadas y a la CTB como adyuvante. Transcurridas 48 horas posteriores al reto realizado durante la prueba de DTH, se obtuvo la epidermis de las orejas de los ratones, de cada una de las condiciones evaluadas y se cultivaron durante 72 horas para obtener las células que se movilizan de la piel al medio de cultivo. Una vez colectadas estas células, se realizó una tinción para observar la presencia de linfocitos CD4 “naive” (A) y con fenotipo de memoria (B). Las gráficas muestran la media más la SD de por lo menos dos experimentos independientes con dos ratones por grupo. Para el análisis estadístico se desarrolló una ANOVA de una vía con una post-prueba de Bonferroni; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos se decidió evaluar si esta respuesta que se desarrolla al inocular la CTB en conjunto con las conidias, era capaz de mantenerse con el tiempo, motivo por el cual se inoculó en las orejas de los ratones a la CTB en conjunto con las conidias, y se dejaron transcurrir 31 días antes de realizar el reto correspondiente con las conidias, evaluando la posible respuesta mediante la aparición de una DTH (Figura 12) y el infiltrado de los linfocitos CD4<sup>+</sup> en la epidermis de las orejas de los ratones evaluados (Figura 13 A y B).

Interesantemente al evaluar la reacción de DTH, se observa que la oreja inoculada inicialmente con la CTB en conjunto con las conidias y retada a los 31 días con las conidias, desarrolló una respuesta del tipo DTH, evidenciada por la presencia de inflamación en la oreja tanto a las 24 horas como a las 48 horas posteriores al reto. (Figura 12)

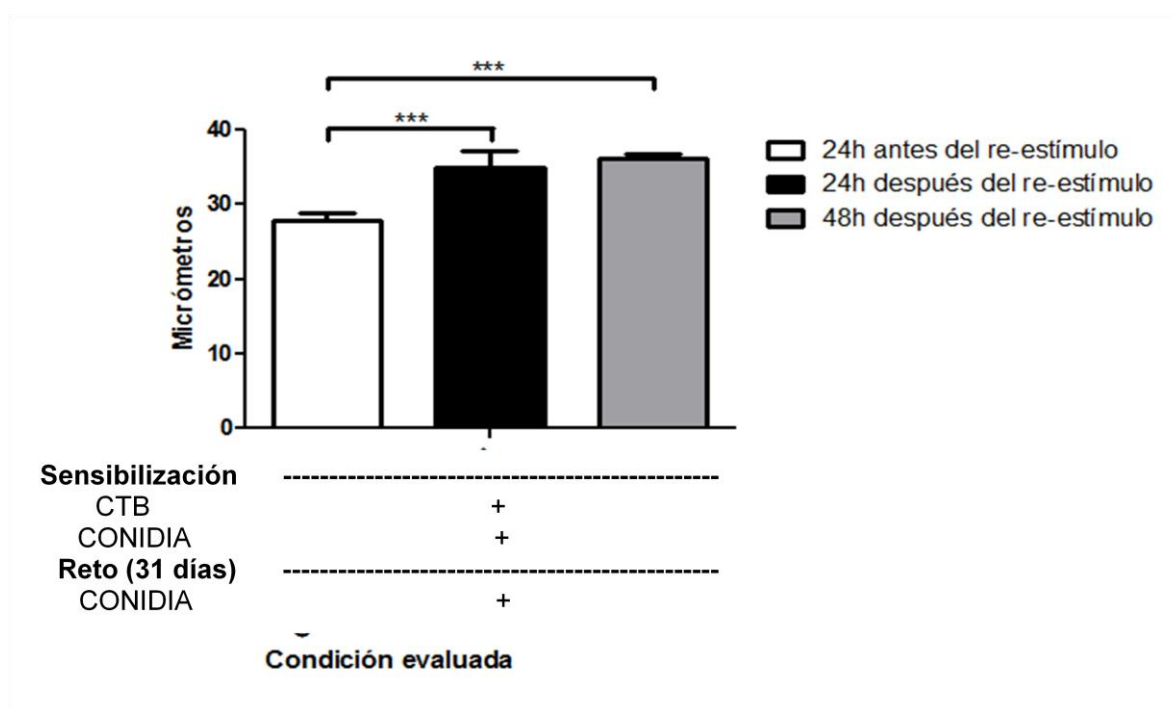
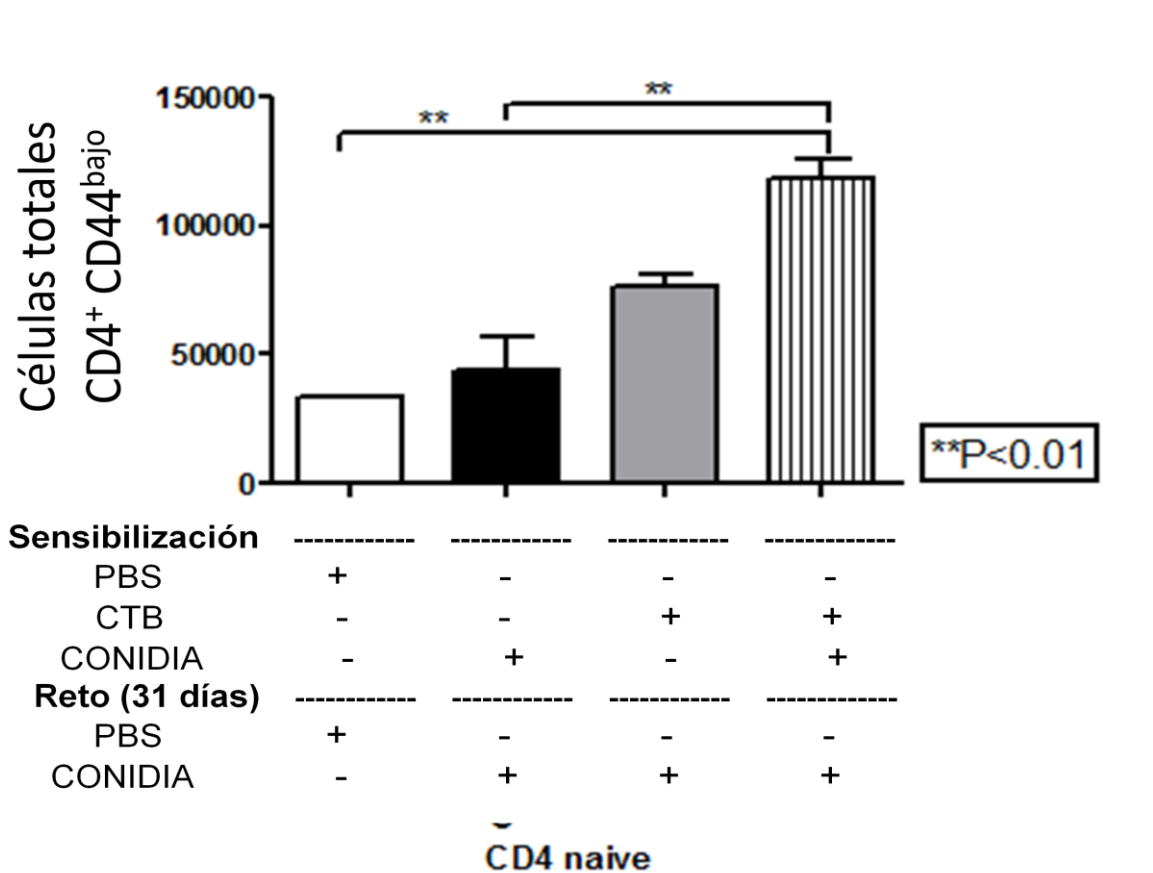


Figura 12.- Respuesta del tipo DTH en las orejas de los ratones, utilizando las conidias inactivadas de SC y a la sub-unidad  $\beta$  no tóxica de la toxina del cólera (CTB) como adyuvante y cuyo reto se realizó 31 días después de la sensibilización. Se inoculó en las orejas de manera i. d. a ratones C57BL/6 con conidias inactivadas ( $5 \times 10^4$  conidias) en conjunto con la CTB (2  $\mu$ g). Después de 31 días de la sensibilización se realizó el reto o re-estímulo en la misma oreja que fue sensibilizada mediante la inoculación i. d. de las conidias inactivadas ( $5 \times 10^4$  conidias). Se midió la inflamación de las orejas 24 horas antes del reto y 24 y 48 horas posteriores al reto. La gráfica muestra la media más la SD de dos experimentos independientes con dos ratones por grupo. Para el análisis estadístico se desarrolló una ANOVA de dos vías con una post-prueba de Bonferroni; \*\*\* $p < 0.001$ .

En cuanto a la presencia de linfocitos T CD4 con fenotipo naive y de memoria se observa que la epidermis de la oreja inoculada inicialmente con la CTB más las conidias y retada a los 31 días con las conidias presenta una mayor cantidad de linfocitos T CD4 con fenotipo naive que el resto de las condiciones evaluadas, sin embargo este aumento solo es estadísticamente significativo con respecto a los controles de PBS retado con PBS, y conidias retado con conidias (Figura 13 A).

Mientras que en el caso de los linfocitos CD4 de memoria también se observó este aumento en la epidermis de la misma oreja (CTB + conidias, retada con conidias), solo que el aumento si fue estadísticamente significativo con respecto a todas las condiciones evaluadas (Figura 13 B).

A)



B)

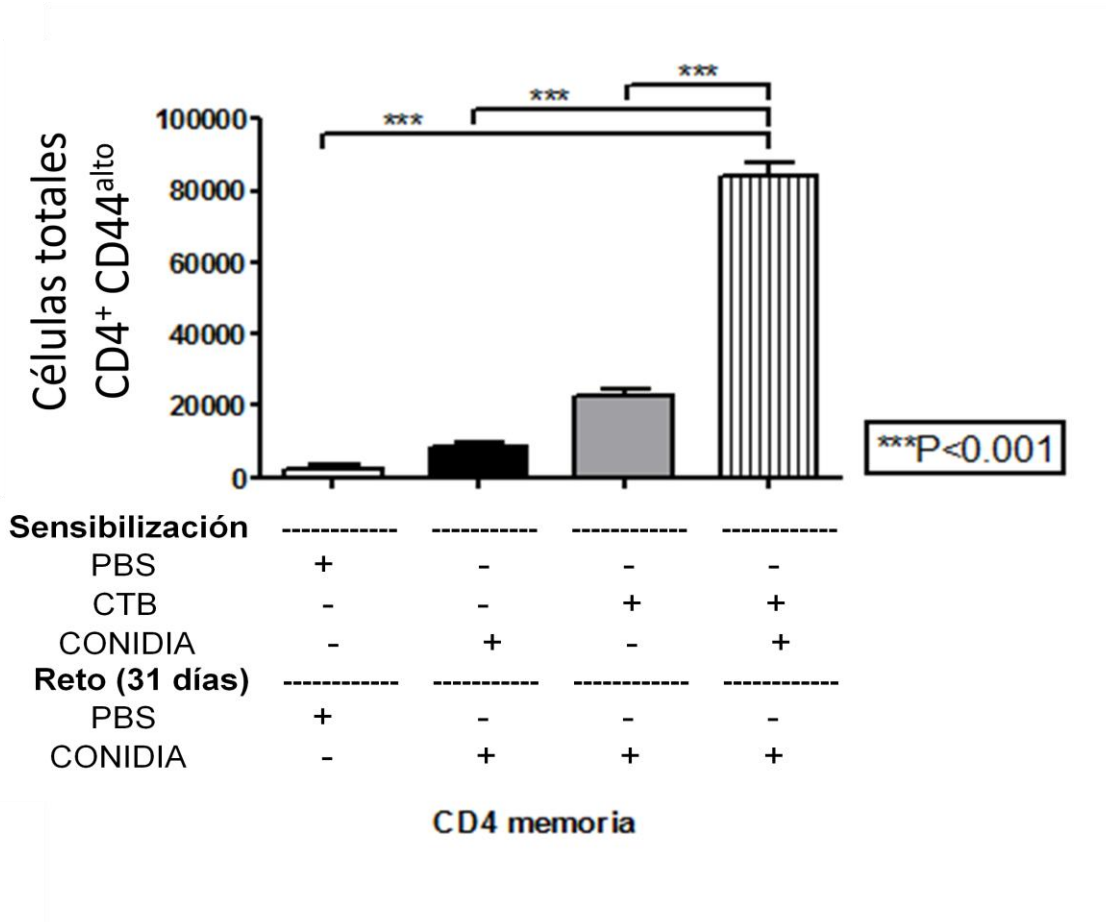


Figura 13.- Presencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la epidermis de las orejas de los ratones evaluados en la DTH, en la que se utilizó las conidias inactivadas y a la CTB como adyuvante y cuyo reto se realizó 31 días después de la sensibilización. Transcurridas 48 horas posteriores al reto realizado durante la prueba de DTH, se obtuvo la epidermis de las orejas de los ratones, de cada una de las condiciones evaluadas y se cultivaron durante 72 horas para obtener las células que se movilizan de la piel al medio de cultivo. Una vez colectadas estas células, se realizó una tinción para observar la presencia de linfocitos CD4 “naive” (A) y con fenotipo de memoria (B). Las gráficas muestran la media más la SD de dos experimentos independientes con dos ratones por grupo. Para el análisis estadístico se desarrolló una ANOVA de una vía con una post-prueba de Bonferroni; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

Estos resultados muestran la capacidad de la CTB como adyuvante, capaz de desarrollar una respuesta inmune celular en piel, al inocularse en conjunto con las conidias del hongo SC, la cual además logra mantenerse con el tiempo.

## ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Actualmente se han desarrollado diversas estrategias de inmunización en piel (27, 28, 29, 32, 34), en las cuales se indica que las DCs presentes en este órgano, son de gran importancia en el desarrollo de una respuesta inmune (32, 39, 40, 41, 42, 56), la cual puede manifestarse de diversas maneras, por ejemplo en el desarrollo de una respuesta del tipo DTH, como se ha observado en los estudios realizados anteriormente en la UIMEA (32) y algunas otras investigaciones (40, 56, 57).

Además varios estudios han evaluado el potencial adyuvante de la TC y la CTB mediante diferentes vías de inoculación, así como en conjunto de diversos antígenos (29, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 44, 45, 48), y se ha demostrado que ambas son capaces de modificar tanto el microambiente, como el fenotipo y la actividad de las DCs, promoviendo de esta manera, el desarrollo de una respuesta inmune con diferentes perfiles inmunológicos (29, 32, 33, 35, 44, 45, 48, 49).

Por otra parte existen reportes que muestran la importancia del desarrollo de una respuesta inmune eficiente en individuos infectados por SC (1, 2, 4, 11). A pesar de que existen algunos modelos experimentales en los que se ha investigado el tipo de respuesta inmune que se desarrolla en contra de este hongo (5, 6, 8, 13, 14, 23), a la fecha el tipo de respuesta inducida por SC así como las bases para la inducción de una respuesta inmune eficaz para proteger contra la infección sin la necesidad de un tratamiento alternativo no han sido estudiadas.

En este trabajo se decidió evaluar dos antígenos de SC (la esporotricina y las conidias inactivadas por calor) en ausencia y presencia de la TC así como de su subunidad  $\beta$  no tóxica como adyuvantes, mediante la inmunización i.d en la oreja, para crear las bases que en un futuro nos permitan desarrollar una vacuna capaz de proteger contra la infección por este hongo.

Los resultados del presente estudio mostraron que tanto la esporotricina como las conidias inactivadas de SC, por si solas no son capaces de inducir una respuesta inmune celular después de la inoculación en la oreja del ratón, sin embargo se observó el desarrollo de una reacción del tipo DTH al inocular tanto la esporotricina como las conidias en conjunto con la TC completa. De manera interesante también se observó esta reacción de DTH, la cual se sostiene en el tiempo, al inocular a las conidias inactivadas por calor de SC en combinación con la CTB. Estos resultados soportan el papel adyuvante de la CTB,

después de la inmunización en la piel (29, 32, 43, 46). La inducción de una DTH sostenida en el tiempo inducida por la inmunización de las conidias y la CTB correlacionó con un aumento en la cantidad de linfocitos T CD4 con fenotipo de memoria infiltrados en la epidermis de las orejas de los ratones.

Los primeros resultados obtenidos nos mostraron el efecto adyuvante de la TC (Figura 1), lo cual podría explicarse, en base a lo reportado en investigaciones anteriores en las que se demuestra que la migración de las células dendríticas de la piel a los ganglios linfáticos drenantes locales, es importante para lograr el desarrollo de una respuesta inmune (32, 42, 58, 59, 60, 61), pero además que la TC promueve la acumulación de linfocitos T activados, en el sitio de inoculación del antígeno (32), que en nuestro caso se trata de las orejas de los ratones, dando lugar a una inflamación local (Figura 1).

Sin embargo el hecho de que la inoculación con la TC provoque una inflamación local, no nos asegura que la respuesta del tipo DTH desarrollada en contra de las conidias de SC sea del tipo local, ya que como se observó en los siguientes experimentos, la realización del reto a los 7 días posteriores a la sensibilización con la TC en conjunto con las conidias, no permite evidenciar el desarrollo de memoria inmunológica (Figura 2 y 3), la cual se pudo observar solo cuando el reto se realizó hasta los 26 días posteriores a la sensibilización. Por lo cual basados en lo antes mencionado, se debería evaluar si la respuesta del tipo DTH es local o sistémica, pero realizando el respectivo reto a los 26 días posteriores a la sensibilización, esperando observar que esta respuesta fuera de tipo sistémica.

También se encontró que al inocularse en la oreja del ratón las conidias inactivadas de SC en conjunto con la TC y retar con las conidias, se logra desarrollar una respuesta del tipo DTH (Figura 2 y 4). Sin embargo cuando el reto con las conidias se realizó a los 7 días posteriores a la sensibilización, esta respuesta solo se mantuvo durante las primeras 24 horas posteriores al reto (Figura 2). Lo que podría indicar que la inflamación observada sería solamente el incremento de una respuesta inflamatoria inespecífica inducida por la TC más la inoculación de la conidia, y no una DTH mediada por linfocitos T CD4, esto concuerda con el hecho de que no se encontraron diferencias en los números de linfocitos T CD4 tanto con fenotipo naive ( $CD4^+ CD44^{bajo}$ ) como de memoria ( $CD4^+ CD44^{alto}$ ) (62, 63) entre las orejas de los ratones inmunizados solamente con la toxina y los inmunizados con la combinación de TC más las conidias inactivadas.



Sin embargo, al dejar transcurrir 26 días después de la sensibilización para realizar el reto con las conidias, la respuesta del tipo DTH, se mantuvo hasta las 48 horas posteriores al reto (Figura 4). Indicando que después de la inoculación con la TC completa solamente es posible evidenciar una DTH específica una vez que la inflamación inicial causada por la TC es menor.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran además que las conidias inactivadas por calor son incapaces de desarrollar una respuesta del tipo DTH por si solas (Figura 2 y 4). Este resultado parece estar en contradicción con otros estudios, pues en estos se menciona que la infección con SC es capaz de desarrollar memoria inmunológica, la cual evidencian mediante el desarrollo de una respuesta del tipo DTH, después de inocular la esporotricina en personas que han sufrido la infección por este hongo y esto se ha utilizado como método de diagnóstico para detectar la infección por SC (1, 4). Sin embargo cabe señalar que en los casos reportados en la literatura, los individuos que desarrollaron la enfermedad, se infectaron con la forma viable de SC, mientras que en nuestros experimentos se utilizaron únicamente las conidias de este hongo y que además fueron inactivadas por calor antes de ser inoculadas en las orejas de los ratones, proceso mediante el cual pierden su capacidad de dividirse. Lo anterior implica que ciertos productos metabólicos involucrados en el desarrollo del hongo se han dejado de producir, y que podrían tener un papel importante en el desarrollo de una respuesta inmune en la que se genere memoria inmunológica en contra de SC.

Los experimentos en los que se inmunizó con las conidias en combinación con la TC demuestran el potencial adyuvante de la TC en piel y definen a las conidias inactivadas de SC como un antígeno capaz de desarrollar una respuesta del tipo DTH, cuando se inoculan en conjunto con la TC. Además se corrobora que la respuesta en contra de las conidias de SC se conforma de manera importante por linfocitos T CD4<sup>+</sup>, lo que concuerda con lo reportado en otros estudios (2, 4, 5, 6, 8, 13, 14, 15).

Considerando el efecto adyuvante en piel de la TC y tomando en cuenta algunos reportes en los que se considera a la esporotricina como un antígeno de SC capaz de desarrollar una respuesta del tipo DTH (1, 4), se decidió inocular a la esporotricina de manera individual y en conjunto con la TC en las orejas de los ratones. Los resultados de estos experimentos demostraron que la esporotricina es incapaz de desarrollar una respuesta del tipo DTH por sí sola (Figura 6), pero que al inocularse en conjunto con la TC se logra desarrollar esta respuesta, la cual fue de menor intensidad tanto en inflamación

como en tiempo de duración de la respuesta (Figura 6), a la obtenida cuando se inocula las conidias inactivadas en conjunto con la TC. La inducción de una DTH menor concuerda con una disminución en los números de linfocitos T CD4 con fenotipo de memoria presentes en la epidermis de las orejas de los ratones, la cual es mucho menor a la que se obtiene cuando se inocula la TC por sí sola (Figura 7 B).

Al igual que para las conidias los resultados mostraron que, la esporotricina es incapaz de lograr una respuesta del tipo DTH por sí sola, y que solo logra desarrollar esta respuesta en presencia de la TC como adyuvante. Estos resultados indican que en los modelos *in vivo* la reacción de hipersensibilidad inducida por la esporotricina solo se da cuando los individuos han sido sensibilizados con la forma viva del hongo, lo que indica que la esporotricina es útil como diagnostico en individuos que han sido infectados con el hongo (1, 4) pero que no es un inmunógeno capaz de inducir por sí sola una respuesta inmune.

Considerando los efectos tóxicos de la TC los cuales limitan su uso en vacunas de aplicación en humanos (51), se decidió evaluar la respuesta que se desarrolla en contra de estos dos antígenos de SC (conidias inactivadas y esporotricina) pero inoculándolos en conjunto con la CTB, la cual se ha reportado que posee un efecto adyuvante similar al de la TC completa pero sin producir inflamación aparente (29, 32). Además, al ser esta subunidad la encargada de la unión específica a las DCs (31, 54), también se le ha considerado como un eficiente acarreador o transportador de antígenos hacia estas células (29, 32, 33, 46, 47, 48, 53), las cuales además se ha reportado están implicadas en la inducción de una respuesta inmune eficiente después de la inoculación en la piel (32, 39, 40, 41, 42, 56, 57).

Sorprendentemente, al inocular la CTB en conjunto con la esporotricina no se observó la inducción de una DTH. Tampoco se observó la presencia de linfocitos T CD4 con fenotipo de memoria en la epidermis de los ratones inmunizados con la esporotricina y la CTB. Por otra parte, de manera interesante se encontró una importante reacción de DTH en las orejas de los ratones que fueron inmunizados con las conidias inactivadas por calor de SC en combinación con la CTB y retados con las conidias tanto a los 7 días como a los 31 días después de la inmunización. En este caso la reacción de DTH correlaciona con la presencia significativa de linfocitos T CD4 con fenotipo de memoria en la epidermis de las orejas de los ratones que fueron inoculados con la combinación de conidias y CTB, estos resultados son acordes con los trabajos en los que se propone a la

CTB como adyuvante (29, 32), pero contradicen otros estudios en los que reportan que la CTB solo funciona como un transportador de antígenos y que el efecto adyuvante de la TC radica en la sub-unidad  $\alpha$  tóxica de esta toxina (CTA) (46, 47, 48, 53).

Estos resultados muestran nuevamente que las conidias de SC son un mejor candidato a antígeno en comparación con la esporotricina. Esto puede ser explicado por qué la esporotricina es un producto obtenido de la fase micelial del hongo (1, 2) y por lo tanto las conidias pueden tener ciertos epítopes antigénicos ausentes en la esporotricina y que son importantes en el desarrollo de la respuesta inmune. Otra explicación es que las conidias pudieran inducir una activación parcial de las células dendríticas de la piel y que pudiera actuar de manera sinérgica con la CTB en la inducción de una respuesta inmune después de su inoculación en la piel. Esto último es apoyado por el resultado de que la inoculación de la esporotricina con la CTB no logro la inducción de una DTH (Figura 8). Lo cual podría implicar que, el efecto adyuvante de la CTB depende en gran medida del antígeno con el cual se inocule en conjunto, además de la vía utilizada, tal y como ha sido reportado en otros trabajos (29, 32, 33).

En resumen los resultados de este trabajo permiten concluir que tanto la TC completa como la CTB poseen un efecto adyuvante en piel que se traduce en la inducción de una respuesta celular de tipo DTH cuando se co-administran con las conidias de SC inactivadas por calor. De manera interesante esta respuesta permanece en el tiempo y correlaciona con la presencia de linfocitos T CD4 con fenotipo de memoria presentes en la epidermis de los ratones inmunizados, sugiriendo la inducción de una respuesta de linfocitos T CD4 de memoria. El estudio además resalta en potencial de la CTB como adyuvante en la inmunización en piel en ausencia de efectos tóxicos e inflamación aparente y propone a las conidias como un antígeno potencial del hongo SC.

Estos resultados pueden en un futuro ser la base para el desarrollo de una vacuna contra S.C utilizando la piel como una vía potencial de inmunización contra un microorganismo que penetra por esta vía.

## **CONCLUSIÓN.**

Estos resultados muestran el potencial de la su sub-unidad  $\beta$  no tóxica de la toxina del cólera como adyuvante de las conidias del hongo SC inactivadas por calor en la inducción de una respuesta inmune celular mediada por linfocitos T CD4<sup>+</sup> después de la inoculación intradérmica en la oreja del ratón.

## BIBLIOGRAFÍA.

- 1) **Bonifaz, Alejandro.** Micología Médica Básica, México, Méndez Editores, Segunda Edición, 2000, pp. 185-206.
- 2) **Arenas Guzmán, Roberto.** Micología Médica Ilustrada, México, Mc. Graw Hill, Tercera Edición, 2008, pp. 149-159.
- 3) **J. Kindt, Thomas., A. Goldsby, Richard., A. Osborne, Barbara.** Inmunología de Kuby, Korea, Mc. Graw Hill, Sexta Edición, 2007, pp. 371-400.
- 4) **Bonifaz A, Vázquez-González D.,** Sporotrichosis: an update. *G. Ital. Dermatol. Venereol.* Oct. 2010; 145(5):659-73. Review.
- 5) **Uenotsuchi T, Takeuchi S, Matsuda T, Urabe K, Koga T, Uchi H, Nakahara T, Fukagawa S, Kawasaki M, Kajiwara H, Yoshida S, Moroi Y, Furue M.,** Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. *Int Immunol.* Dec. 2006; 18(12):1637-46.
- 6) **Koga T, Duan H, Urabe K, Furue M.,** Immunohistochemical localization of activated and mature CD83+ dendritic cells in granulomas of sporotrichosis. *Eur. J. Dermatol.* Nov-Dec. 2001; 11(6): 527-9
- 7) **Arrillaga-Moncrieff I, Capilla J, Mayayo E, Marimon R, Mariné M, Gené J, Cano J, Guarro J.,** Different virulence level of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clin. Microbiol. Infect.* Jul. 2009; 15(7): 651-5.
- 8) **Kajiwara H, Saito M, Ohga S, Uenotsuchi T, Yoshida S.** Impaired Host Defense against *Sporothrix schenckii* in Mice with Chronic Granulomatous Disease. *Infect Immun.* Sep 2004; 72(9):5073-9.
- 9) **Filler SG, Sheppard DC.** Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Pathog.* Dec 2006; 2(12):e129. Review
- 10) **Fernandes KS, Mathews HL, Lopes Bezerra LM.** Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. *J Med Microbiol.* 1999 Feb; 48(2):195-203.
- 11) **Carvalho MTT, de Castro AP, Baby C, Werner B, Neto JF, Queiroz-Telles F.** Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS: report of a case. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2002; 35:655.

- 12) **Carlos IZ, Sgarbi DB, Angluster J, Alviano CS, Silva CL.** Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. *Mycopathologia* 1992; 117:139.
- 13) **Tachibana T, Matsuyama T, Mitsuyama M.** Involvement of CD4+ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. *Med. Mycol* 1999; 37:397.
- 14) **Koga T, Duan H, Furue M.** Immunohistochemical detection of interferon- $\gamma$ -producing cells in granuloma formation of sporotrichosis. *Med. Mycol* 2002;40:111.
- 15) **Fujimura T, Asai T, Muguruma K, Masuzawa M, Katsuoka K.** Local expression of migration inhibitory factor and Th1 type cytokine mRNA in sporotrichosis lesions. *Acta Dermato-Venereol.* (Stockh.) 1996; 76:321.
- 16) **Netea MG, Van der Graaf C, Van der Meer JWM, Kullberg BJ.** Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2004; 23:672.
- 17) **Roeder A, Kirschning CJ, Rupoc RA, Schaller M, Weindl G, Korting HC.** Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med. Mycol.* 2004; 42:485.
- 18) **Netea MG, Van der Meer JWM, Kullberg BJ.** Role of the dual interaction of fungal pathogens with pattern recognition receptors in the activation and modulation of host defence. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006; 12:404.
- 19) **Zhou LJ, Tedder TF.** Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 1995; 154: 3821-35.
- 20) **Koga T, Matsuda T, Ota K, Ishizaki H, Matsumoto T, Hori Y.** Cytokine production of peripheral blood mononuclear cells in a patient with sporotrichosis in response with sporotrichin. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1994; 74: 328.
- 21) **Macatonia SE, Hosken NA, Litton P, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A.** Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 1995; 154: 5071-9.
- 22) **Fernandes, K. S., A. L. Coelho, L. M. Lopes Bezerra, and C. Barja-Fidalgo.** Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. *Immunology* 2000, 101:563-569.
- 23) **Shiraishi, A., K. Nakagaki, and T. Arai.** Role of cell-mediated immunity in the resistance to experimental sporotrichosis in mice. *Mycopathologia* 1992, 120:15-21.

- 24) **Miyaji M, Nishimura K.** Defensive role of granuloma against *Sporothrix schenckii* infection. *Mycopathologia* 1982; 80: 117- 124.
- 25) **Takata M, Ishizaki H.** Correlation among culture times, sugar composition and biological activities of *Sporothrix schenckii* antigens. *Mycopathologia* 1983; 84: 31-39.
- 26) **Lopes Alves L, Travassos LR, Previato JO, Mendonça-Previato L.** Novel antigenic determinants from peptidorhamnomannans of *Sporothrix schenckii*. *Glycobiology* 1994; 4: 281-288.
- 27) **He, R., Oyoshi, M. K., Jin, H. and Geha, R. S.,** Epicutaneous antigen exposure induces a Th17 response that drives airway inflammation after inhalation challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007. 104: 15817–15822.
- 28) **Strid, J., Hourihane, J., Kimber, I., Callard, R. and Strobel, S.,** Disruption of the stratum corneum allows potent epicutaneous immunization with protein antigens resulting in a dominant systemic Th2 response. *Eur. J. Immunol.* 2004. 34: 2100–2109.
- 29) **Anjuere, F., George-Chandy, A., Audant, F., Rousseau, D., Holmgren, J. and Czerkinsky, C.,** Transcutaneous immunization with cholera toxin B subunit adjuvant suppresses IgE antibody responses via selective induction of Th1 immune responses. *J. Immunol.* 2003. 170: 1586–1592.
- 30) **Datta, S. K., Sabet, M., Nguyen, K. P., Valdez, P. A., Gonzalez-Navajas, J. M., Islam, S., Mihajlov, I. et al.,** Mucosal adjuvant activity of cholera toxin requires Th17 cells and protects against inhalation anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 10638–10643.
- 31) **Kawamura, Y. I., Kawashima, R., Shirai, Y., Kato, R., Hamabata, T., Yamamoto, M., Furukawa, K. et al.,** Cholera toxin activates dendritic cells through dependence on GM1-ganglioside which is mediated by NFκB translocation. *Eur. J. Immunol.* 2003. 33: 3205–3212.
- 32) **Meza-Sánchez D, Pérez-Montesinos G, Sánchez-García J, Moreno J, Bonifaz LC.** Cholera Toxin and its non-toxic βsubunit promote an efficient IFN-γ and IL-17 CD4 (+) T cell Differentiation after immunization in the ear depending of migrating DCs. *Eur J Immunol.* 2011 Jul 26. doi: 10.1002/eji.201040997.

- 33) **Eriksson, K., Fredriksson, M., Nordstrom, I. and Holmgren, J.**, Cholera toxin and its B subunit promote dendritic cell vaccination with different influences on Th1 and Th2 development. *Infect. Immun.* 2003. 71: 1740–1747.
- 34) **King, I. L., Kroenke, M. A. and Segal, B. M.**, GM-CSF-dependent, CD1031 dermal dendritic cells play a critical role in Th effector cell differentiation after subcutaneous immunization. *J. Exp. Med.* 207: 953–961.
- 35) **Williams, N. A., Hirst, T. R. and Nashar, T. O.**, Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. *Immunol. Today* 1999. 20: 95–101.
- 36) **Yamamoto, S., Kiyono, H., Yamamoto, M., Imaoka, K., Fujihashi, K., Van Ginkel, F. W., Noda, M. et al.**, A nontoxic mutant of cholera toxin elicits Th2-type responses for enhanced mucosal immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997. 94: 5267–5272.
- 37) **Schaffeler, M. P., Brokenshire, J. S. and Snider, D. P.**, Detection of precursor Th cells in mesenteric lymph nodes after oral immunization with protein antigen and cholera toxin. *Int. Immunol.* 1997. 9: 1555–1562.
- 38) **Lee, J. B., Jang, J. E., Song, M. K. and Chang, J.**, Intranasal delivery of cholera toxin induces Th17-dominated T-cell response to bystander antigens. *PLoS One* 2009. 4: e5190.
- 39) **Moser, M. and Murphy, K. M.**, Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat. Immunol.* 2000. 1: 199–205.
- 40) **Bennett, C. L., van Rijn, E., Jung, S., Inaba, K., Steinman, R. M., Kapsenberg, M. L. and Clausen, B. E.**, Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol.* 2005. 169: 569–576.
- 41) **Kissenpfennig, A., Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builhe, C., Perrin, P., Romani, N., Tripp, C. H. et al.**, Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 2005. 22: 643–654.
- 42) **Sen, D., Forrest, L., Kepler, T. B., Parker, I. and Cahalan, M. D.**, Selective and site-specific mobilization of dermal dendritic cells and Langerhans cells by Th1- and Th2-polarizing adjuvants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010. 107: 8334–8339.
- 43) **Lycke, N., T. Tsuij, and J. Holmgren.** The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins is linked to their ADPribosyltransferase activity. *Eur. J. Immunol.* 1992, 22: 2277–2281.



- 44) **Braun, M. C., J. He, C.-Y. Wu, and B. L. Kelsall.** Cholera toxin suppresses interleukin (IL)-12 production and IL-12 receptor  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 chain expression. *J. Exp. Med.* 1999, 189: 541–552.
- 45) **Gagliardi, M. C., F. Sallusto, M. Marinaro, A. Langenkamp, A. Lanzavecchia, and M. T. De Magistris.** Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming *Eur. J. Immunol.* 2000, 30: 2394–2403.
- 46) **Sun, J. B., C. Rask, T. Olsson, J. Holmgren, and C. Czerkinsky.** Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by feeding myelin basic protein conjugated to cholera toxin B subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93: 7196–7201.
- 47) **Rask, C., J. Holmgren, M. Fredriksson, M. Lindblad, I. Nordström, J.-B. Sun, and C. Czerkinsky.** Prolonged oral treatment with low doses of allergen conjugated to cholera toxin B subunit suppresses immunoglobulin E antibody responses in sensitized mice. *Clin. Exp. Allergy*, 2000, 30: 1024–1032.
- 48) **George-Chandy, A., K. Eriksson, M. Lebens, I. Nordström, E. Schön, and J. Holmgren.** Cholera toxin B subunit as a carrier protein promotes antigen presentation and increases CD40 and CD86 expression on antigen presenting cells. *Infect. Immun.* 2001, 69: 5716–5725.
- 49) **Bromander, A. K., J. Holmgren, and N. Lycke.** Cholera toxin stimulates IL-1 production and enhances antigen presentation by macrophages in vitro *J. Immunol.* 1991, 146: 2908–2914.
- 50) **Kuchroo, V. K., M. P. Das, J. A. Brown, A. M. Ranger, S. S. Zamvil, R. A. Sobel, H. L. Weiner, N. Nabavi, and L. H. Glimcher.** B7–1 and B7–2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell.* 1995, 80: 707–718.
- 51) **Glenn, G. M., T. Scharon-Kersten, R. Vassell, G. R. Matyas, and C. R. Alving.** Transcutaneous immunization with bacterial ADP-ribosylating exotoxins as antigen and adjuvant. *Infect. Immun.* 1999, 67: 1100.
- 52) **Tamura, S., Y. Shoji, K. Hasiguchi, C. Aizawa, and T. Kurata.** Effects of cholera toxin adjuvant on IgE antibody response to orally or nasally administered ovalbumin. *Vaccine.* 1994, 12: 1238.

- 53) **Sun, J. B., J. Holmgren, and C. Czerkinsky.** Cholera toxin B subunit: an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994, 91: 10795.
- 54) **Holmgren, J., and L. Lindholm.** Cholera toxin, ganglioside receptors and the immune response. *Immunol. Commun.* 1976, 5: 737.
- 55) **Freeman, G. J., V. A. Boussiotis, A. Anumanthan, G. M. Bernstein, X.-Y. Ke, P. D. Rennert, G. S. Gray, J. G. Gribben, and L. M. Nadler.** B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity.* 1995, 2: 523.
- 56) **Romani, N., S. Holzmann, C.H. Tripp, F. Koch, and P. Stoitzner.** Langerhans cells—dendritic cells of the epidermis. *APMIS.* 2003, 111: 725–740.
- 57) **Itano, A.A., S.J. McSorley, R.L. Reinhardt, B.D. Ehst, E. Ingulli, A.Y. Rudensky, and M.K. Jenkins.** Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity.* 2003, 19: 47–57.
- 58) **Kamath, A.T., S. Henri, F. Battye, D.F. Tough, and K. Shortman.** Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood.* 2002, 100: 1734–174.
- 59) **Pulendran B, Ahmed R.** Translating innate immunity into immunological memory: Implications for vaccine development. *Cell.* 2006, 124: 849–863.
- 60) **Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R.** A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol.* 2008, 9: 310–318.
- 61) **Kissenpfennig A, et al.** Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: Dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity.* 2005, 22: 643–654.
- 62) **Blander JM, Sant'Angelo DB, Metz D, Kim SW, Flavell RA, Bottomly K, Janeway CA Jr.** A pool of central memory- like receptors CD4 T cells contains effector memory precursors. *J Immunol.* 2003, Mar 15; 170 (6): 2940-8.
- 63) **Swain, S. L., M. Croft, C. Dubey, L. Haynes, P. Rogers, X. Zhang, L. M. Bradley.** From naive to memory T cells. *Immunol. Rev.* 1996, 150: 143.
- 64) **Arenas-López, G.** Obtención y valoración comparativa de esporotricina de la fase micelial y levaduriforme. *Tesis Fac. Química, UNAM.* 1986.