

# **Análisis ultraestructural de la infectividad de *Sporothrix schenckii* a epitelios.**

**Sandoval Bernal G<sup>1</sup>, González Juárez M<sup>1</sup>, Talamas Rohana P<sup>2</sup>, Rosales Encinas JL<sup>2</sup> Shibayama M<sup>2</sup>, Tsutsumi V<sup>2</sup> y Sabanero López M<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Instituto de Investigación en Biología Experimental. Universidad de Guanajuato, <sup>2</sup>Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular . CINVESTAV IPN Unidad Zacatenco.  
[myrna@quijote.ugto.mx](mailto:myrna@quijote.ugto.mx)

## **Introducción:**

*Sporothrix schenckii* es un hongo dimorfo y patógeno de humanos y animales, causa la esporotricosis, una micosis oportunista cutánea / subcutánea granulomatosa de curso subagudo y crónico, frecuentemente asociada a padecimiento linfático nódular. La esporotricosis es reportada como una micosis emergente debido a la utilización de terapias inmunosupresivas, SIDA, cáncer y alcoholismo [1]. Las interacciones entre patógeno y el tejido hospedero son el paso inicial de la infección, sin embargo las bases que rigen dicho proceso, han sido poco estudiadas.

## **Objetivo**

Elucidar los mecanismos involucrados en la patogénica ultraestructural de *S. schenckii* sobre el tejido epitelial.

## **Metodología**

Cultivos de células epiteliales L929 fueron expuestos a diferentes tiempos de interacción con levaduras de *S. schenckii* (5, 12, 24 y 48 h) [2]. Después de la interacción, las muestras fueron procesadas para: 1) inmunocitoquímica para tubulina, 2) citoquímica para actina [3], así como para 3) MET y SEM. Finalmente las muestras fueron procesadas para ensayos citoquímicos con DAPI, naranja de acridina, inmunodetección de caspasa 3 y fragmentación de DNA [4].

## **Resultados**

Con el fin de determinar si la interacción de las levaduras de *S. schenckii* era capaz de promover de alteración sobre la morfología del epitelio, se realizó la interacción por 5, 12, 24 y 48 h. Conforme transcurre el tiempo de interacción de las levaduras con los epitelios, se observó alteración en la integridad de la monocapa, pérdida de los contactos celulares, alteración morfológica de la célula blanco y a tiempos largos de interacción (48 h), se presentó efecto citopático sobre la célula blanco. Sin embargo en este trabajo se consideró a las fibras epiteliales de tubulina y de actina como marcadores de daño celular por la interacción con las levaduras. Durante la interacción, se observó la alteración en el arreglo de las fibrillas de tubulina y actina, Estos experimentos sugieren que el daño al citoesqueleto es dependiente del tiempo de interacción de las levaduras con los epitelios Por otra parte, se analizó la interacción entre las levaduras de *S. schenckii* y los epitelios a nivel ultraestructura. Después de 5 h de interacción, se aprecia que el material microfibrilar electrón denso de la pared celular del hongo está en íntimo contacto con la membrana plasmática de la célula epitelial. A 12 h de interacción, la levadura, está en íntimo contacto con la membrana plasmática epitelial. A ese mismo tiempo de interacción la célula blanco, presento indicios de daño celular, como edematización de mitocondrias,

citólisis, cambios en la continuidad del perímetro y tamaño nuclear y vacuolización del citoplasma. En la célula epitelial a las 72 h de interacción, se observa a las levaduras adheridas a la superficie celular, presentándose condensación de cromatina, pérdida de la polaridad celular, pérdida de los contactos celulares y cambio en la relación núcleo – citoplasma. Estos resultados sugieren que la interacción promueve daño ultraestructural de manera tiempo dependiente. Para analizar los cambios en la superficie de la célula epitelial por la interacción con las levaduras de *S. schenckii*, se utilizó la microscopía electrónica de barrido. A las 12 h de interacción, se observó que el patógeno comienza a alterar la integridad de la monocapa epitelial, existe pérdida de los contactos celulares, así como la formación de ampollas o “blebs” sobre la superficie celular. Sin embargo, a las 48 h de interacción de las levaduras con los epitelios se observó daño sobre la monocapa epitelial. Finalmente, por medio de ensayos citoquímicos con DAPI y naranja de acridina, inmunodetección de caspasa 3 y fragmentación de DNA, se observó que la interacción del hongo, desencanta apoptosis en el tejido epitelial.

## Discusiones

En este trabajo, demostramos que la interacción de las levaduras con el tejido epitelial, promueve daño celular y alteraciones anatomoultraestructurales de manera tiempo dependiente, esto esta en relación con la habilidad que posee el patógeno para invadir y dañar al tejido blanco. El daño celular que promueve *S. schenckii*, pudiera ser mediado por la acción de proteasas, las cuales están relacionadas con la patogenicidad del hongo. Se sabe que aspartil proteasas y fosfolipasas son relevantes para invasión y daño a tejidos por levaduras patógenas [5]. Se conoce que en los procesos de alteración morfológica participa el citoesqueleto. En este trabajo, se observó que las levaduras promueven rearrreglos del aparato microtubular del epitelio de manera tiempo dependiente. Resultados similares han sido reportados durante la interacción de otros patógenos con tejidos, *Listeria monocytogenes*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Candida albicans*, los cuales son capaces de promover señalización vía MAPK's induciendo alteración en la arquitectura del citoesqueleto, originando alteración en la arquitectura de los microtúbulos y disipación de filamentos de actina, favoreciendo la internalización del patógeno, continuando con la ruta transcelular de diseminación [6]. Por otra parte, el análisis ultraestructural de la interacción entre las levaduras de *S. schenckii* y los epitelios mostró la superficie del epitelio a 12 h de interacción responde emitiendo prolongaciones citoplasmáticas que rodean a la levadura. De manera sorprendente se observó en un campo a 48 h de interacción una levadura internalizada en el epitelio, la cual estaba dentro de una vacuola endocítica. Sin embargo, ha sido determinado que algunos microorganismos patógenos son capaces de inducir su propia endocitosis por células no profesionalmente fagocíticas, por ejemplo *Candida albicans* [7], *Cryptococcus neoformans* [8], *Aspergillus fumigatus* [9], a través de monocapas endoteliales. Finalmente, por medio de ensayos citoquímicos con DAPI y naranja de acridina, inmunodetección de caspasa 3 y fragmentación de DNA, se observó que la interacción del hongo, desencanta apoptosis en el tejido epitelial. Existe evidencia que muestra que otros patógenos como *Trypanosoma cruzi*, *Entamoeba histolytica*, *Leishmania mexicana*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*, son capaces de promover y/o mediar la muerte celular por necrosis y apoptosis en células blanco por la acción de serín proteasas [10]. En suma todos estos datos, indican que la interacción de *S. schenckii* con epitelio, involucra eventos de señalización que afectan la arquitectura celular, permitiendo la dinámica de invasión y

diseminación del parásito hacia el tejido hospedero. El conocer los procesos de interacción fúngica pueden servir como base para entender aspectos de la biología de la esporotricosis y en un futuro pueden servir de apoyo para el desarrollo de nuevas drogas antifúngicas dirigidas contra receptores esenciales.

### **Bibliografía**

- [1] Ramos-e-Silva M, Vasconcelos C, Carneiro S., Cestari T, Clinical Dermatology, (2007) 181-187.
- [2] Figueiredo CC, Lima OC, Carvalho L, Lopes – Bezerra LM and Morandi V, Microbial Pathogenesis, (2004) 36:177-188.
- [3] Meza I, Sabanero M, Stefani E and Cerejido M, Celular Biochemistry, (1982) **18**:407-421.
- [4]González – Juárez, M (2008). Apoptosis en tejido epitelial por interacción con *Sporothrix schenckii*. Tesis de Maestro en Ciencias: Biología. Instituto de Investigación en Biología Experimental. Universidad de Guanajuato.
- [5] Muller FM, Morschhauser J, Kohler G, Oesleschlaeger TA, Ziebuhr W and Hacker J, Mycoses, 42 (1999) 39-42.
- [6] Mendes - Giannini JS, Taylor ML, Bouchara JB, Burger E, Calich KG, Duarte – Escalante, E, Hanna SA, Lenzi HL, Machado MP, Miayani M, Monteiro da Silva JL, Mota EM, Restrepo A, Restrepo S, Tronchini G, Vincezi LR, Xidieh CF, and Zenteno E, Medical. Mycology, 38 (2000) 113-123.
- [7] Ibrahim AS, Filler SG, Alcouloumre MS, Kozel TR, Edwards JE and Ghannoum MS, Infection and. Immunity, (1995) 63: 4368-4374.
- [8] Zink S, Thorsten NAB, Rosen P and Ernest JF, Infection and Immunity, (1996) 64: 5085-5091.
- [9] Lopes – Bezerra LM and Filler SG, Blood, (2004) 10: 2143-2149.
- [10] Egger L, Schneider J, Rhême, Tapernpoux M, Hëcki J and Borner C, Cellular Death Differentiation, (2003) 10: 1188-1203.

### **a) Tema en el cual quiere presentar su trabajo:**

**II. CIENCIAS BIOLÓGICAS, MEDICINA Y FORENSE: La microscopía en las enfermedades infecciosas**

### **b) Datos completos del responsable y co-autores que incluya, nombre completo, grado académico, Institución, dirección académica, teléfono trabajo y correo electrónico:**

#### **Autores:**

- a) **MC. Gerardo Sandoval Bernal.** Estudiante de Doctorado Tradicional en Biología. Instituto de Investigación Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Col. Noria Alta, Guanajuato, Guanajuato 36000, México. Phone: + (473) 7322006 Ext. 8158. Fax: +(473)-7322007 Ext. 8151. [gerardosandoval@hotmail.com](mailto:gerardosandoval@hotmail.com)
- b) **MC. Micaela González Juárez.** Instituto de Investigación Instituto de Investigación en Biología Experimental [mgi00@hotmail.com](mailto:mgi00@hotmail.com)
- c) **Dra. Myrna Sabanero Lopez.** Instituto de Investigación Instituto de Investigación en Biología Experimental [myrna@quijote.ugto.mx](mailto:myrna@quijote.ugto.mx)

**Coautores:**

- d) **Dra. Patricia Talamas Rohana.** Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, México, D.F. 07360, México. Phone: +(52)-555061-3800 Ext: 5627. Fax: +(52)55 5061-3398. [ptr@cinvestav.mx](mailto:ptr@cinvestav.mx).
- e) **Dra. Mineko Shibayama Salas.** Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. [mineko@cinvestav.mx](mailto:mineko@cinvestav.mx)
- f) **Dr. Victor Tsutsumi.** Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. [vtsutsu@cinvestav.mx](mailto:vtsutsu@cinvestav.mx)

c) Su preferencia entre presentación oral o cartel: **cartel.**