
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



**INDUCCIÓN *in vitro* DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS
(NET) CON *Trichophyton rubrum***

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER TÍTULO DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA

PRESENTA

JOSÉ ROBERTO PRIETO CORREA

Zapopan Jalisco, Julio del 2013



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

COORD-BIO-100/2012

C. JOSÉ ROBERTO PRIETO CORREA
PRESENTE

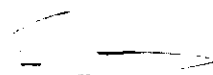
Manifiestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción Tesis, con el título "**INDUCCION DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NET) CON *Trichophyton rubrum***", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director(a) de dicho trabajo al **Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez**.

Si en mas por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac Zapopan, Jalisco, 07 de junio del 2012.


DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN


M.C. VERÓNICA PALOMERA AVALOS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

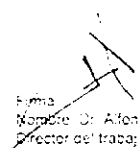
A quien corresponda
Presidente del Comité de Titulación
Licenciatura en Biología
CUCBA
Presente

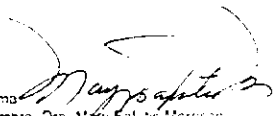
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación modalidad Tesis e informes opción Tesis con el título: "Inducción in vitro de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) con *Trichophyton rubrum*" que realizó el/a pasante José Roberto Prieto Correa con número de código 205191736 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo

Atentamente

Lugar y fecha
Zapopan Jalisco, México 7 mayo de 2013

Firma 
Nombre: Dr. Alfonso Islas Rodríguez
Director del trabajo

Firma 
Nombre: Dra. Mary Felicitas Morrison
Asesor del trabajo

Nombre completo de las Socias integrantes del Comité de Titulación

Firma de aprobación

Fecha de aprobación

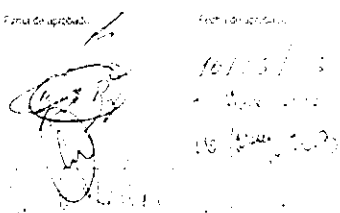
Dra. Galina Petrovna Zaitseva

Dr. Ramón Reynoso Orozco

Dr. Arturo Orozco Barocio

Supl:

Dra. Martha Cecilia Téllez Bañuelos


10/05/13
15/05/13

COMITÉ DE
TITULACIÓN



Sede del estudio

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Péptidos Naturales del Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara (U de G).

Dependencias e instituciones participantes

Centro de Investigación en Inmunología y Dermatología (CIINDE) del Instituto Dermatológico de Jalisco.

Laboratorio de Micología del Instituto Dermatológico de Jalisco.

Laboratorio de Investigación en Inmunología del Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS).

Director de Tesis: **Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez**

Asesora de Tesis: **Dra. Mary Fafutis Morris**

Asesor Externo de Tesis: **Dr. Leopoldo Flores Romo**

Agradecimientos.

A DIOS

Gracias divino por la existencia, la conexión, la meditación y por la sanación, y lo más importante por haberme brindado la oportunidad de conocer tu mundo a través de la biología.

A MIS PADRES

Roberto Prieto y Bernardina Correa

Faltan palabras para agradecer todo el apoyo, la atención y motivación que me brindaron desde mi formación escolar hasta mi formación profesional, los buenos consejos y regaños hoy comienzan a rendir frutos, porque siempre creyeron en mí en las buenas y en las malas, muchas gracias papás.

A LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

En conjunto con el centro universitario de ciencias biológicas, por haberme dado la oportunidad de prepararme como profesional en la carrera de Lic. Biología.

A MI DIRECTOR DE TESIS

Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez

Por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su idea, por su amistad, su confianza, sus conocimientos, sus consejos, sus regaños y su apoyo que fueron claves y me guiaron para desarrollar un buen trabajo, gracias por ser un buen ejemplo y por haberme involucrado en otros proyectos que ampliaron aun mas mis conocimientos, capacidades y habilidades en la investigación biológica.

A MIS ASESORES DE TESIS

Dra. Mary Fafutis Morris - Dr. Leopoldo Flores Romo

Gracias doctora por brindarme el apoyo durante mi estancia en el instituto Dermatológico. A toda la gente que me hizo sentir bien y me apoyó, a las doctoras Cecilia y Anabel, a "peque" y al Biólogo Mayorga. Al Dr. Leopoldo por su aportación con la técnica de las NET, gracias por haberme ayudado en mi formación y por hacerme sentir en un buen ambiente de trabajo.

A MIS SINODALES

Doctores: Galina Petrovna Zaitseva- Ramón Reynoso Orozco- Arturo Orozco Barocio- Martha Cecilia Tellez Bañuelos.

Por sus puntuales observaciones y aportaciones en la revisión de este trabajo que en conjunto se logró para mejorarlo.

A LA PERSONA MÁS ESPECIAL DE MI VIDA

Paola Alejandra Aranda

Por tu apoyo, tus regaños, tus consejos y porque siempre estuviste conmigo durante la carrera compartiendo todo y al pendiente de mí, muchas gracias.

A MIS PROFESORES

Por todo lo enseñado en lo teórico y práctico de las materias, por compartir sus conocimientos para la formación de nuevos talentos.

A MIS AMIGOS Y HERMANOS

Porque fueron parte en esta etapa final de la carrera con los buenos momentos de distracción y relajamiento.

“PAZCIENCIA”

“Para que correr si se puede caminar con la seguridad de no caer, no vaya a ser que se te quede el entendimiento atrás y te tengas que devolver por él.”

José Gaona.

ÍNDICE DE CONTENIDO	Pág.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	5
3.1 Origen del sistema inmune	5
3.1.1 Inmunidad en invertebrados y en vertebrados	8
3.2 Perspectiva evolutiva de la inmunidad innata	10
3.2.1 La piel como mecanismo de defensa	14
3.2.2 Sistema del complemento y péptidos antimicrobianos	16
3.3 Fagocitos: Principales células de la respuesta inmune innata	18
3.3.1 Mecanismos de acción de los fagocitos	19
3.3.2 Neutrófilos: origen y desarrollo celular	21
3.4 Infecciones por hongos patógenos	23
3.4.1 Las dermatofitosis	24
3.4.2 Inmunidad innata contra hongos patógenos	25
3.4.3 <i>Trichophyton rubrum</i> y la inmunidad innata	25
3.5 Trampas extracelulares de neutrófilos: Estructura y función	27
3.5.1 Formación y liberación de las NET	29
3.5.2 Las NET y su relación con enfermedades	34
4. JUSTIFICACIÓN	38
5. OBJETIVO GENERAL	39
5.1 Objetivos particulares	39
6. HIPÓTESIS	40
7. METODOLOGÍA	41
8. MATERIALES Y MÉTODOS	44
8.1 Cultivo de <i>Trichophyton rubrum</i>	44
8.2 Aislamiento de conidias de <i>T. rubrum</i>	45
8.3 Homogenado de conidias de <i>T. Rubrum</i>	45
8.4 Aislamiento de neutrófilos a partir de sangre periférica Humana	46
8.5 Inducción de trampas extracelulares de neutrófilos	47
9. RESULTADOS	48
9.1 Aislamiento y cultivo de <i>T. rubrum</i>	48
9.2 Aislamiento de conidias completas de <i>T. rubrum</i>	48
9.3 Homogenado de conidias de <i>T. rubrum</i>	48
9.4 Inducción de trampas extracelulares de neutrófilos	49
10. DISCUSIÓN	56
11. CONCLUSIONES	58
REFERENCIAS.	59

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Evolución del Sistema Inmune	8
Figura 2. Rutas conservadas en la RII en <i>Drosophila</i> y mamíferos	9
Figura 3. RII en la interacción de PAMP con receptor tipo Toll	11
Figura 4. Patrón de reconocimiento de Carbohidratos. PAMP-PRR	12
Figura 5. Estructura de la piel	14
Figura 6. PRR de células inmunológicas que actúan en la piel	15
Figura 7. Ciclo de vida de los neutrófilos	21
Figura 8. Estructura interna del PMN en acción con en el fagosoma	22
Figura 9. Mecanismos de Inmunidad contra hongos patógenos	25
Figura 10. Estrategias antimicrobianas de neutrófilos	28
Figura 11. Trampas Extracelulares de Neutrófilos	29
Figura 12. Mecanismos que activan y liberan NET	31
Figura 13. Efecto molecular para la formación y liberación de NET	32
Figura 14. Modelo molecular de la NE y MPO en la formación de NET	33
Figura 15. Mecanismos bacterianos de evasión NET	34

Figuras de los resultados

Figura 16. Viabilidad del cultivo	48
Figura 17. Aislamiento y sonicado de conidias de <i>T. rubrum</i>	49
Figura 18. Experimento 1	50
Figura 19. Experimento 2	51
Figura 20. Experimento 3	52
Figura 21. Experimento 4	53
Figura 22. Experimento 5	54
Figura 23. Experimento 6	55

CUADROS

Cuadro 1. Infecciones por Hongos patógenos	23
Cuadro 2. Factores microbianos que inducen la formación de NET	29
Cuadro 3. Relación de NET con las enfermedades	35

ABREVIATURAS.

CCR2: Receptor de citocina tipo 2

DNA: Ácido Desoxirribonucleico.

DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindole

EGC: Enfermedad Granulomatosa Crónica.

GM-CSF: Factor Estimulante de Colonias Granulomatocíticas

HDP: Péptidos de la Defensa del Hospedero.

IFN: Interferón.

IL-1: Interleucina Uno.

IL-10: Interleucina Diez.

IL-12: Interleucina Doce.

IL-15: Interleucina Quince.

IL-18: Interleucina Dieciocho.

IL-20: Interleucina Veinte.

IL-6: Interleucina Seis.

IL-7: Interleucina Siete.

IL-8: Interleucina Ocho.

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

LPS: Lipopolisacáridos.

LRR: Repeticiones Ricas en Leucina.

MAC: Complejo de Ataque a la Membrana.

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

MPO: Mieloperoxidasa.

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato.

NE: Elastasa del Neutrófilo.

NET: Trampas Extracelulares de Neutrófilos.

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NK: Natural Killer.

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral.

PAMP: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos.

pH: Potencial de Hidrógeno.

PKC: Proteína Kinasa tipo C.

PBS: Tampón de fosfato salino

PMA: Miristato de Forbol.

PMN: Polimorfonuclear.

PR3: Proteinasa Tres.

PRR: Receptores de Reconocimiento de Patrones.

RAG: Genes de Activación y Recombinación.

RIA: Respuesta Inmune Adaptativa.

RII: Respuesta Inmune Innata.

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno.

SI: Sistema Inmune.

TLALP: Tejido Linfóide Asociado a la Piel.

TLR: Receptor Tipo Toll.

TLR-4: Receptor Tipo Toll Cuatro.

TLR-9: Receptor Tipo Toll Nueve.

1.- RESUMEN

El Sistema Inmune ha evolucionado siguiendo una escala filogenética entre las especies, desarrollando mecanismos y perfeccionando técnicas para el reconocimiento de lo propio y lo extraño, lo peligroso y no peligroso. Los invertebrados por ejemplo, han mantenido un mecanismo de inmunidad innata basado en el reconocimiento de partículas extrañas y la producción de moléculas antimicrobianas que actúan en el momento de la infección. A partir de los placodermos que son los primeros vertebrados, se presentan por primera vez en la evolución los genes de activación y recombinación (RAG), que constituyen el segundo mecanismo de inmunidad que complementa al innato, llamado inmunidad adaptativa, produciendo células que generan memoria y anticuerpos.

Los humanos como la mayoría de invertebrados y vertebrados conservan la inmunidad innata con base en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos y no patógenos (PAMP) por medio de receptores de reconocimiento de los PAMP o PRR. Lo anterior desencadena una vía de señales y producción de péptidos antimicrobianos e interleucinas. Los queratinocitos humanos pueden producir lo anterior, dejando atrás el concepto de que la piel solo funciona como una barrera física, conformando el concepto de inmunidad local, que incluye los macrófagos y en especial a los neutrófilos, que además de su función fagocítica, degranulan sustancias antimicrobianas y son capaces de formar redes llamadas trampas extracelulares de neutrófilos (NET), formadas principalmente de DNA, histonas y péptidos antimicrobianos en respuesta a agresiones por patógenos. Estas NET son inducidas por bacterias y hongos (Brinckmann y col., 2004). En este trabajo se utilizaron neutrófilos aislados de sangre periférica humana y se pusieron en contacto con conidias completas de *Trichophyton rubrum* y sonicados de conidias del mismo hongo, como inductores de la formación de NET. Este parásito resulta un problema de salud pública entre la población, como una de las principales dermatofitosis en la consulta clínica, y es rebelde a los tratamientos, afecta a los queratinocitos y puede causar lesiones más severas en individuos inmunosuprimidos.

Los resultados de este trabajo demostraron que los neutrófilos aislados y cultivados *in vitro* son inducidos para formar NET cuando se estimularon con conidias completas y homogenado de conidias de *T. rubrum*, las conidias interactúan con las redes de DNA, pero lo más interesante es el efecto inductor del sonicado de conidias, ya que pudiera funcionar como vacuna.

2. INTRODUCCIÓN

Desde etapas muy tempranas de la aparición de la vida, el Sistema Inmune (SI) ha evolucionado y permitido así que los organismos se adapten al medio, desarrollando mecanismos para reconocer lo extraño y lo propio, así como generar defensas contra elementos del medio ambiente que ponen en riesgo su integridad, y luchar contra otros organismos tanto por los recursos como por la supervivencia de su especie.

En este proceso se abrieron niveles nuevos de adaptación. Desde la generación de las membranas y de un núcleo celular organizado hasta el control, orden y diseño para fabricar y estructurar los distintos organelos y moléculas efectoras para la supervivencia (Janeway, 2001).

En los eucariotas primitivos se desarrollaron mecanismos de defensa contra partículas extrañas, virus y bacterias. Estos mecanismos utilizan en principio receptores de reconocimiento e implican vías de señales por medio de moléculas que se encuentran entre la membrana celular y el citoplasma hasta llegar al núcleo para activar genes que codifican moléculas contra agentes nocivos. Estos mecanismos aun se conservan en los eucariotas desde los más sencillos hasta los organismos pluricelulares más complejos (Hoffman, 1999).

Desde invertebrados hasta mamíferos, estos han competido entre sí, pero también contra agentes infecciosos que se encuentran en el medio ambiente y que amenazan sus funciones vitales. Los mecanismos de defensa contra microorganismos patógenos son conocidos como Respuesta Inmune Innata (RII) y Respuesta Inmune Adaptativa (RIA), incluyen moléculas y células que están genéticamente controladas y varían entre las especies, pero mantienen similitud entre sí (Janeway, 1998).

Los seres humanos no escapan a lo anterior, y luchan por la vida con los agentes patógenos. Sin embargo, los microorganismos también han desarrollado estrategias que incluyen mecanismos de resistencia y evasión, para perpetuar su especie, consiguiendo con la participación de la selección natural, un equilibrio a través del tiempo, que ha implicado incluso individuos biológicos como consorcios (Doan, 2008; Margulis y Sagan, 2002).

Lo anterior implica la existencia de microorganismos que no son patógenos y conviven de manera simbiótica con el hospedero constituyendo la microbiota normal, por lo que no activan los mecanismos de defensa como patógenos y se consideran no peligrosos (Margulis y Sagan, 2002; Matzinger, 2003).

En los humanos se presentan enfermedades infecciosas ocasionadas por virus, bacterias y hongos patógenos que desarrollan mecanismos de adaptación para sobrevivir en el hospedero; y generar estas enfermedades que cada vez son más frecuentes entre la población, ya que suelen ser rebeldes al tratamiento y se adaptan al medio para desarrollarse.

Las infecciones fúngicas más frecuentes entre la población son las dermatofitosis o tiñas. En México es un problema que se presenta entre el 70 y 80% de todas las micosis. Por tener una frecuencia muy elevada como infección en distintas partes del cuerpo, se cree que este patógeno ha desarrollado modos de supervivencia para escapar de los mecanismos de defensa del hospedero, como consecuencia se expresa la enfermedad con síntomas molestos e incómodos para el paciente (Arenas, 2002).

Las barreras físicas como piel, mucosas, vellos, secreciones corporales, etc., constituyen la primera línea de defensa de la RII. Los péptidos antimicrobianos, la fagocitosis y la participación del sistema del complemento son mecanismos importantes de esta respuesta (Medzhitov, 2000).

La RII está también integrada por glóbulos blancos granulocitos y macrófagos, su principal función es fagocitar hongos y destruir bacterias. (Nathan, 2006).

Los neutrófilos son un tipo de granulocito, cuya función es responder al estímulo de bacterias, hongos y otros parásitos para eliminarlos, y a participar en el inicio del proceso inflamatorio (Appelberg, 2006).

Se han realizado investigaciones recientes que indican, que los neutrófilos, bajo condiciones de infección, pueden generar redes o fibras extracelulares en el sitio de una infección ocasionada por agentes patógenos, llamadas trampas extracelulares de neutrófilos, por sus siglas en inglés (NET), las cuales son estructuras compuestas principalmente de DNA, histonas, elastasa y péptidos antimicrobianos, que están presentes en el núcleo y los gránulos del citoplasma. El DNA del núcleo de la célula viva, es expulsado al exterior de la membrana, y como resultado los microorganismos quedan atrapados en la red, eliminándolos e iniciando el proceso de cicatrización y regeneración del tejido.

Este mecanismo de defensa de la RII tiene afinidad por microorganismos patógenos, en este trabajo se experimentó con conidias completas y extracto sonificado de conidias del hongo *Trichophyton rubrum* con la finalidad de inducir la formación de redes extracelulares de DNA de neutrófilos de sangre periférica humana *in vitro* en ambos casos. (Brinkmann, 2004; Islas, 2007; García, 2011).

3. ANTECEDENTES

3.1 Origen del sistema inmune

El SI está integrado por las mencionadas RII y la RIA, incluyen moléculas y células especializadas. Ambas han evolucionado tanto para convivir con los microbios como para defenderse de ellos (Janeway, 2005).

Los orígenes de la inmunidad están ligados a las ideas expuestas por Charles Darwin hace 150 años. Darwin opinaba que la selección natural y la diversificación son las principales fuerzas de la organización de la vida, inspirando así teorías inmunológicas, relacionadas con el hecho de que los humanos y los patógenos están encerrados en su propia supervivencia, “la lucha por la vida” y la “sobrevivencia del más apto”. Su teoría también ayudó a los investigadores a darse cuenta que algunas de nuestras defensas inmunes dependen de las diversas variantes de proteínas defensivas.

Poco después de “El origen de las especies” publicado en 1859, se descubrieron las enfermedades infecciosas y se convirtieron en un ejemplo convincente de la “lucha darwiniana”; seres humanos enfrentados a patógenos; para entender esa contienda, se reveló la importancia de los dos mecanismos de defensa que compiten: Por un lado, el sistema de anticuerpos en los humores corporales, y por otro lado las células móviles conocidas como fagocitos. Paul Ehrlich defendió la primera; Elie Metchnikoff se enfocó en lo segundo (Travis, 2009).

El SI es un conjunto de órganos que probablemente evolucionaron para defender al hospedero de amenazas externas e internas, así como para reconocer nuestras propias células y moléculas (Janeway, 2002; Matzinger, 2002).

La RII puede ser específica como la RIA; particularmente interesante es el descubrimiento de un rearrreglo de genes en lampreas, similar a la de los genes variables, genes de diversidad y los de unión que se recombinan para lograr una versión molecular siempre apta al determinante antigénico, que depende a su vez de los genes de activación de la recombinación (RAG por sus siglas en inglés) (Bottaro, 2006), y así es como se puede lograr una novedosa diversificación somática también en los genes de algunos moluscos, por lo que no deberían considerarse sistemas aparte sino complementarios (Flajnik, 2004).

La evolución es un proceso constante inducido por los cambios ambientales, la fuerza que la empuja y que permite la sobrevivencia de una especie es su adaptación al medio ambiente. Los organismos se adaptan a los cambios de temperatura, pH, alimentos, oxígeno, agua y al efecto de otros organismos dañinos y benéficos (Pigliucci, 2007).

La constante presión de patógenos en el SI humano, ha permitido a estos desarrollar herramientas para bloquear la respuesta inmune. Ellos diversifican sus moléculas de superficie, enmascaran los antígenos más reconocibles, se disfrazan como células propias, producen moléculas específicamente para deshabilitar los mecanismos de defensa del mismo manipulando la maquinaria celular del hospedero. Lo anterior pudo surgir mediante la adquisición de material genético de otro organismo. Un patógeno completamente nuevo puede evolucionar de una especie comensal e inofensiva a una totalmente agresiva para el hombre, al cruzar las barreras entre especies.

Los patógenos coevolucionan con el SI humano, tan pronto como un patógeno desarrolla herramientas para escapar de un mecanismo inmune particular, este se vuelve inútil en la protección contra la infección. Sin embargo con la evolución puede modificarse para terminar con las estrategias del patógeno, o bien, desarrollar y utilizar otro mecanismo nuevo que se afine con la eliminación del microorganismo (Woolhouse, 2005).

Los mecanismos inmunes innatos en los humanos, que funcionan a nivel celular se remontan a los organismos unicelulares, la fagocitosis en las amibas por ejemplo que tenía fines nutricionales, empezó a funcionar para reconocer si la otra amiba estaba infectada (Langman, 1989), y fue después utilizada por los organismos multicelulares, con fines inmunológicos, mientras que los mecanismos adaptativos concernientes a la especificidad que se desarrollaron en los vertebrados se han afinado en los mamíferos. Algunos mecanismos se seleccionaron y adquirieron un papel más importante en la protección inmune, mientras que otros se perdieron. Estos mecanismos o sistemas complejos, quizá han evolucionado más allá de la apariencia de la especie en la cual se han encontrado, y han sido modulados por factores ligados no solo a la evolución interna de sus genes, sino por sus microambientes también internos, como las limitaciones celulares, metabólicas, reproductivas y tamaño de la progenie. Parece ser que los buenos resultados biológicos de la evolución son de larga duración, es por esta razón que algunos de los elementos del sistema inmune de los invertebrados pueden ser encontrados en los vertebrados. También, es la razón de porqué los dominios de las inmunoglobulinas han sido utilizados de muchas maneras incluso extraimunológicas (MHC), y de nuevo tuvieron una evolución por su cuenta.

El estudio comparativo de los sistemas inmunes desde el punto de vista filogenético, muestra una dinámica particular y diversa. Las comparaciones entre las soluciones elegidas por los varios *Phylum*, del reino animal, cercanos al *Homo sapiens*, nos permiten distinguir las características esenciales del sistema inmune. Desde este punto de vista, este enfoque no solo es filogenético sino aplicativo. Al incrementar este tipo de conocimiento se pueden sugerir mejores soluciones clínicas en los casos de deficiencias y anormalidades inmunológicas de los humanos (Du Pasquier, 2000).

3.1.1. Inmunidad en invertebrados y en vertebrados.

Considerada la primera línea de defensa de los animales, la inmunidad innata involucra el reconocimiento de patrones de moléculas de patógenos por receptores presentes en las células inmunes que se presentan en el sitio de la infección (Medzhitov, 2000).

Metchnikoff reconoció la importancia de esta observación, utilizando larvas de equinodermos observó que las células tratan de defender a la larva al ingerir al invasor, en este caso una espina, un proceso conocido como fagocitosis.

De hecho, es un mecanismo fundamental por el que las criaturas de todo el reino animal se defienden contra la infección, un evento que dio lugar al concepto de la inmunidad celular (Fig 1), (Beck, 1996).

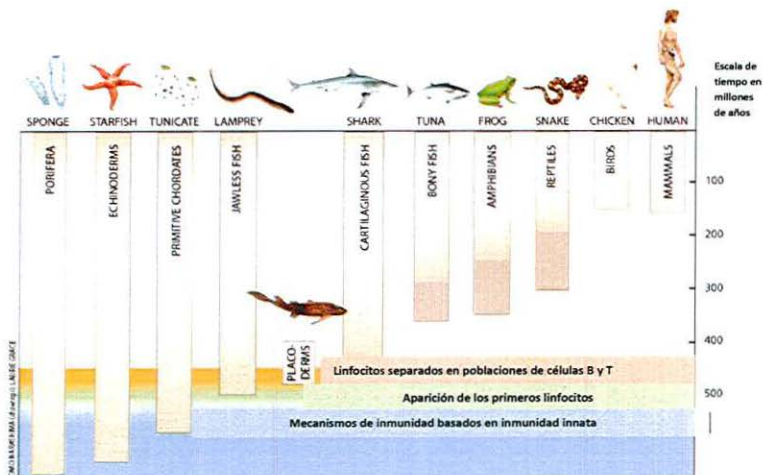


Figura 1.- Evolución del SI. Escala evolutiva; aparición de los mecanismos de inmunidad de invertebrados y vertebrados a través del tiempo (Modificado de Beck, 1996).

Desde el punto de vista de la evolución, la fagocitosis es probablemente la más antigua de las respuestas inmunes, rastreable incluso en los protozoos. Los estudios comparativos de las lombrices de tierra, ascidias, esponjas y otros, sugieren que la respuesta inflamatoria se remonta al origen de la multicelularidad. Los invertebrados han sobrevivido a la amenaza de extinción, debido en parte a la

evolución y conservación de los mecanismos útiles y esenciales del sistema inmune innato y a la reproducción en gran número, que ha servido para preservar las especies. Son organismos balanceados equipados con las herramientas adecuadas para hacer frente a diversos problemas ambientales tanto como a los microbios presentes en la naturaleza (Beck, 1994).

En artrópodos como los insectos, se descubrió la novedosa vía de fenol-oxidasa, que desencadena un mecanismo de inmunidad en la mosca de la fruta. Además se demuestran las similitudes en el reconocimiento de patógenos, entre insectos y mamíferos. Las rutas de señalización y mecanismos efectores de la inmunidad innata, tanto en *Drosophila* como en mamíferos, son muy parecidas (Fig 2), (Hoffman, 1999).

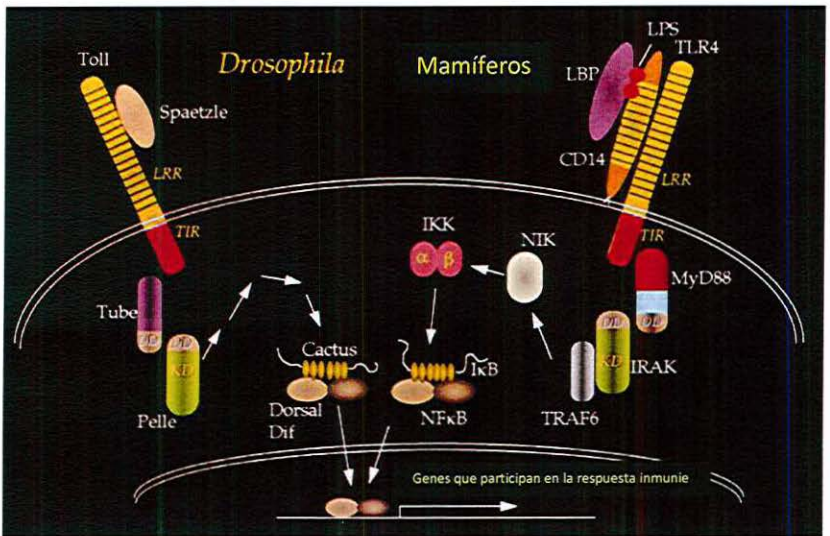


Figura 2.- Rutas conservadas en la RII en *Drosophila* y mamíferos (Modificado de Hoffman, 1999).

En lo que ha sido llamado el "big bang de la inmunología," la mayoría de los vertebrados desarrolló una segunda forma de inmunidad, en la cual las células del sistema inmune adaptativo, son dirigidas contra un patógeno específico y luego algunas se mantienen latentes con memoria inmunológica, para si es necesario dividirse posteriormente y así abreviar el tiempo de respuesta.

Esta adaptación apareció hace unos 450 millones de años y puede ser el resultado fortuito de la invasión de DNA introducido por un virus o microbio infectante a una criatura en forma de pez que los paleontólogos llaman *Placodermos* (Agrawal, 1998).

El repertorio de los receptores de adaptación se genera en cada individuo y se selecciona adicionalmente con especificidad para antígenos encontrados durante la vida del individuo, que expresa receptores específicos implicando una respuesta inmune fuerte, generada por la diversidad inmunológica (Tonegawa, 1983).

3.2 Perspectiva evolutiva de la inmunidad innata

Los estudios sobre la inmunidad durante las últimas décadas se han concentrado en la respuesta adaptativa, sólo muy recientemente la inmunidad innata adquirió renovado interés, especialmente por tratarse de un mecanismo evolutivo, la defensa antigua, que es esencial. La división de los mecanismos de defensa para clasificarlos en RII y RIA se basan en la naturaleza de sus receptores. Los receptores innatos parecen estar codificados en el genoma como genes separados. Por lo contrario, los receptores adaptativos son codificados como matrices de segmentos de genes aleatoriamente recombinados durante el desarrollo de las células T y B. (Beutler, 2000).

La RII incluye el reconocimiento del patógeno y una fase efectora tal como la fagocitosis y la secreción de moléculas protectoras. El reconocimiento de constituyentes microbianos desencadena una respuesta caracterizada por la activación de células endoteliales, y otras células como neutrófilos y macrófagos, las cuales de manera importante sintetizan péptidos antimicrobianos, lo que permite el control rápido de la infección (Medzhitov y Janeway, 2000).

La terminología para describir los elementos y procesos implicados en la inmunidad innata en varios sistemas animales y vegetales incluye el término Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP), para indicar a los disparadores de las respuestas inmunes en organismos tan diversos como el humano, el ratón, los crustáceos, insectos y plantas. Los PAMP incluyen lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas, peptidoglicanos de bacterias Gram positivas, flagelina eubacteriana, glucanos derivados de paredes celulares fungales, quitina, mananos y proteínas (Fig 3).

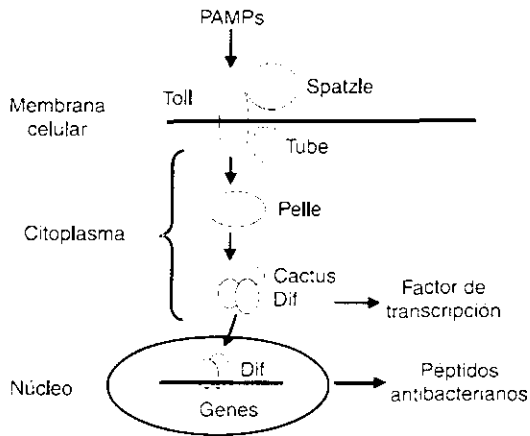


Figura 3. RII en la interacción de PAMP con receptor tipo Toll. Ruta de señales y moléculas participantes a través del interior de la célula (Camilo 2003).

Los PAMP, son reconocidos por Receptores de Reconocimiento de Patógenos (PRR), presentes en la membrana de las células del hospedero (Fig 4), (Medzhitov y Janeway, 1997; Jones, 2006; Hoffman, 1999).

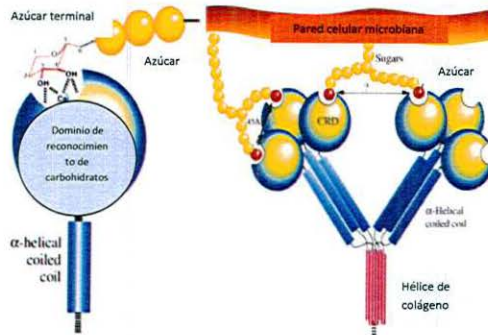


Figura 4.- Interacción PAMP-PRR. Patrón de reconocimiento de carbohidratos que reconoce a los azúcares terminales de la pared celular bacteriana (Modificado de Hoffman, 1999).

La capacidad de reconocer a los PAMP sugiere una evolución común para el reconocimiento de microorganismos y para la activación de las defensas antimicrobianas en los organismos multicelulares. Los PAMP son estructuras conservadas y abundantes, típicas en todas las clases de patógenos. Tales patrones parecen estar ausentes en los organismos hospederos eucariotes pero son esenciales para la supervivencia de los microorganismos teniendo una fuerte capacidad de inducir y en algunos casos manipular la RII (Janeway, 2002; Medzhitov, 2010).

En las células inmunes de los vertebrados, los PAMP son reconocidos predominantemente por una clase de receptores que se asemejan a la proteína Toll entre otros. Los genes Toll se describieron inicialmente en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, cuyos productos actúan como moduladores de la polarización dorso-ventral durante el desarrollo embrionario (Anderson, 1985).

Posteriormente se estableció que los receptores tipo Toll eran parte fundamental de la inmunidad innata de la mosca para su defensa en contra de infecciones bacterianas y micóticas (Lemaitre, 1996).

Estos receptores están compuestos de dominios extracitoplásmicos con repeticiones de Leucina, por sus siglas en ingles (LRR), un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático parecidos a los receptores de interleucina 1 (IL-1) y otro dominio Toll, (TIR) por sus siglas en ingles. El receptor tipo Toll (TLR) presente en organismos más evolucionados, posee diez motivos LRR sucesivos que sirven para unirse al antígeno (Takeda, 2003).

Los receptores TLR también detectan señales de "peligro". Se ha planteado que el SI no solo es capaz de distinguir lo propio de lo no propio, sino que también se activa en situaciones de estímulos propios como en el caso del cáncer (peligroso), y por otro lado no se activa en el caso de microorganismos benéficos de la microbiota normal, que no representan peligro. (Matzinger, 2002).

En la inmunidad innata intervienen las barreras físicas y químicas, tales como: el epitelio y las sustancias antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales. Las proteínas plasmáticas, las cuales incluyen miembros del sistema de complemento, proteínas de fase aguda y otros mediadores de inflamación. Las células NK, neutrófilos, macrófagos y leucocitos granulares (Rollinghoff, 1997).

Los fagocitos realizan una labor de gran importancia, ya que son los principales productores de las interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α y además liberan otras moléculas como: la enzima activadora de plasminógeno y fosfolipasa, radicales de oxígeno, peróxido, el factor activador de plaquetas, óxido nítrico y mediadores lipídicos de inflamación, tales como prostaglandinas y leucotrienos (Trinchieri, 1997).

3.2.1 La Piel como mecanismo de defensa.

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, es la primera barrera protectora contra infecciones o agresiones del ambiente. La piel humana tiene dos compartimentos: la epidermis y la dermis (Fig 5).

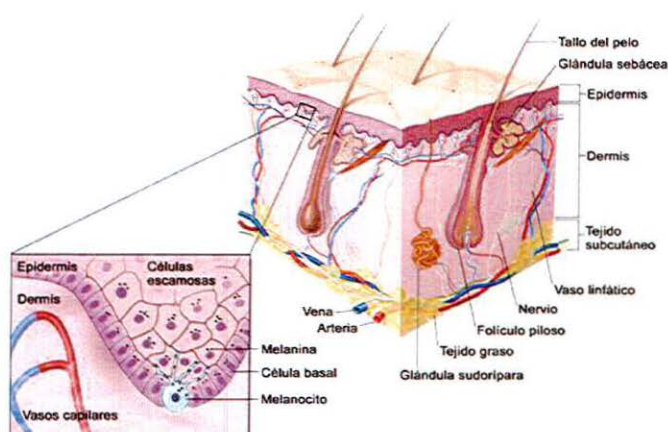


Figura 5.- Estructura de la Piel. Los queratinocitos son las principales células que constituyen a la epidermis formada por cinco capas o estratos (Winslow, 2008).

La epidermis es un epitelio escamoso, es el compartimento más externo y está compuesto por cuatro estratos: estrato basal, el estrato espinoso, el estrato granuloso y el estrato córneo (Uitto, 2007).

Los queratinocitos constituyen el 90% de las células de la epidermis y pueden encontrarse otros tipos celulares, como los melanocitos y las células de Merckel. La dermis es un tejido fibroelástico, formado por una red de colágeno y fibras elásticas. Contiene unas redes vasculares dispuestas paralelamente a la superficie cutánea y conectada entre sí por los vasos verticales.

Se encuentran fibras (colágenas, elásticas y reticulares), células (fibroblastos, mastocitos y macrófagos), elementos vasculares, neurales y anexos (pelos, glándulas ecrinas, apocrinas y sebáceas), (Nestle, 2009).

Debido a que la piel es la superficie más expuesta al medio externo, tiene un papel importante en la defensa del hospedero. En los últimos años, se ha reconsiderado el concepto de Tejido Linfoide Asociado a la Piel (TLAP) con base en que se ha descrito un variado sistema de vigilancia inmune en la piel, que la convierte en un componente activo de defensa, dejando atrás el concepto de ser solo una barrera de defensa. Los queratinocitos y las células de Langerhans en la epidermis, así como los mastocitos, las células dendríticas y los macrófagos en la dermis, funcionan como centinelas de las señales de peligro, incluyendo la invasión por microorganismos debido a que expresan gran variedad de receptores, tales como los de manosa, receptores de dectina, CD1d y PRR, entre los que destacan los TLR (Fig 6), (Kupper, 2004).

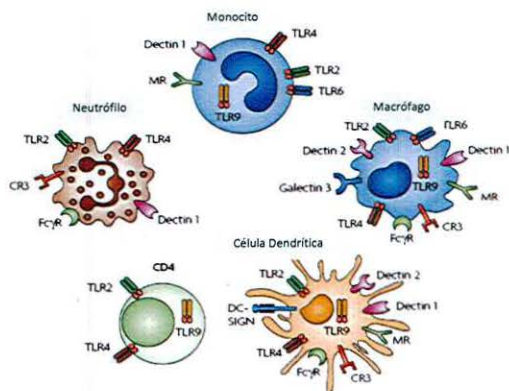


Figura 6.- Receptores de reconocimiento de patrones (PRR) de células inmunitarias que actúan en la piel (Modificado de Kupper, 2004).

Las interleucinas son moléculas importantes para la regulación y activación del sistema inmune. A nivel de la piel, los queratinocitos son grandes productores de interleucinas, tanto de manera constitutiva como en respuesta a estímulos. Entre las interleucinas que producen están IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-18, IL-20, y TNF- α (Köllisch, 2005; Gröne, 2002).

3.2.2 Sistema del Complemento y Péptidos Antimicrobianos

Los factores del complemento desempeñan un papel clave. Las bacterias Gram negativas contienen peptidoglicanos en su pared celular que activan la vía alterna del complemento. El complejo de ataque de membrana, por sus siglas en inglés (MAC), lisa especialmente a la *Neisseria*. Algunos PRR son secretados por el hígado y funcionan como opsoninas. Los receptores lectina de unión a manana se unen a los carbohidratos de la pared celular de una gran variedad de microorganismos y la marcan para su reconocimiento por la vía de las lectinas de la cascada del complemento. Esta vía se diferencia de la clásica porque no requiere complejos antígeno-anticuerpo. Durante la activación del complemento, también se generan mediadores de inflamación, tales como C5a y C3a, los cuales reclutan macrófagos y neutrófilos. Ocasionando una reacción inflamatoria local en el sitio de la infección (Carroll, 2004).

Las defensinas y otros péptidos antimicrobianos son de las primeras líneas de defensa contra microorganismos, los péptidos antimicrobianos también conocidos como péptidos de la defensa del hospedero, por sus siglas en inglés (HDP) funcionan como un escudo de moléculas que limitan el crecimiento de una gran cantidad de microorganismos, y que pueden ser constitutivos o inducibles (Boman, 1995). Estos péptidos, contienen menos de 200 aminoácidos y son producidos por diferentes células, se expresan de forma constitutiva o inducible dependiendo del organismo y del tejido en el que estén presentes al momento de la infección, y tienen un amplio espectro antimicrobiano y múltiples mecanismos de acción (Hancock, 2000).

Los HDP se han encontrado en casi todos los seres vivos, desde los procariotas, con las bactericinas, a los eucariotas, como mamíferos, anfibios, insectos y plantas con una familia diversa de péptidos. Pueden clasificarse según su estructura secundaria y su composición, como lineales, de hélice alfa (tales como cecropinas, magaininas y mellitinas), caracterizados por el enriquecimiento de uno o dos aminoácidos, que contienen puentes disulfuro (defensinas, protegrinas) y fragmentos de otras proteínas más grandes con actividad antibacteriana (Bullet, 2004; Brogden, 2005).

La mayoría de los HDP descritos son codificados por genes y se sintetizan en los ribosomas, aunque existen otros que son el resultado de metabolitos secundarios (por ejemplo, la lactoferrina). El espectro de actividad de los HDP es amplio. Se encuentra actividad antiviral, antifúngica, antibacteriana e, incluso, en algunos casos, antitumoral. Sus mecanismos de acción son múltiples e incluyen interacciones con la membrana celular, inhibición de la síntesis proteica y de ácidos nucleicos, con funciones inmunomoduladoras, quimiotácticas y en el proceso de cicatrización (Yang, 2004; Hale, 2007).

Se ha encontrado que la linfa de los insectos, los gránulos de los neutrófilos humanos y la piel de las ranas contienen péptidos que matan bacterias. Desde entonces se han observado más de 600 péptidos catiónicos con propiedades antimicrobianas en casi todas las especies.

Algunos de estos péptidos, además de destruir directamente a microorganismos, son capaces de reclutar y promover otros elementos de la inmunidad, particularmente de la inmunidad innata lo que genera el concepto de péptidos de defensa del hospedero y péptidos antimicrobianos (Scoot, 2000; Brown, 2006).

Los HDP tienen también funciones inmunomoduladoras, controlan la expresión de cientos de genes en monocitos y células epiteliales, también actúan con efecto quimiotáctico sobre las células del sistema inmune, y en la inducción de citocinas y diferenciación celular, promoviendo la angiogénesis, la cicatrización de las heridas y la resolución de las infecciones (Oppenheim, 2005; Bowdish, 2005).

Uno de los péptidos más estudiados es la catelicidina LL37, con capacidad quimiotáctica sobre monocitos, neutrófilos y células CD4, y capaz de unirse a los lipopolisacáridos, inhibiendo la respuesta celular inducida por estos últimos, como la liberación de TNF- α , de óxido nítrico y de otros factores tisulares (Steinstraesser, 2008).

Algunos fragmentos de péptidos antimicrobianos que, a pesar de no tener actividad sobre las bacterias, exhiben mecanismos inmunomoduladores sobre el proceso de cicatrización, al inducir la expresión de interleucinas como la IL-8, estimular la proliferación de queratinocitos y aumentar la infiltración leucocitaria (Lee, 2004). Otros inhiben la actividad de la oxidasa de los neutrófilos e inducen proteoglicanos y heparansulfato, moléculas importantes en el proceso de cicatrización. Algunas de estas funciones se consideran proinflamatorias, pero de hecho, estos péptidos pueden suprimir las respuestas de la vía de señalización dependiente de receptores TLR y la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α (Shi, 1996; Gallo, 1994; Bowdish, 2005).

3.3 Fagocitos: Células sanguíneas de la Respuesta Inmune

Los fagocitos especializados son células que incluyen a los neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y mastocitos. Poseen receptores celulares en su superficie que son capaces de distinguir entre sustancias propias y ajenas al cuerpo. Esta especificidad es la base del reconocimiento de lo propio frente a lo ajeno, y sustenta la defensa contra infecciones (Dale, 2008).

Durante las infecciones, los fagocitos especializados son atraídos a la zona invadida por patógenos mediante señales químicas procedentes de las bacterias o de otros fagocitos que se encuentran presentes previamente. La atracción, se debe a que los receptores celulares del fagocito unen ciertas sustancias de los patógenos, lo que les permite reconocerlos y fagocitarlos. Algunos fagocitos como los neutrófilos destruyen a los patógenos mediante especies reactivas del oxígeno, por sus siglas en inglés (ROS) y óxido nítrico (Janeway, 2001).

Además de su función inmune también limpian el organismo de células en apoptosis, las células viejas, infectadas y transformadas y las proteínas dañadas, mal plegadas y agregadas. La primera función de los fagocitos en la ontogenia humana no es defensa pero si la eliminación de células apoptóticas durante la organogénesis. Este proceso difiere de la fagocitosis de patógenos por la naturaleza de las citocinas liberadas. Los fagocitos se tragan a las células apoptóticas que secretan factores anti-inflamatorios tales como la interleucina 10 (IL-10), mientras que aquellos patógenos que envuelven secretan mediadores pro-inflamatorios, por ejemplo, la IL-6 que atraen y activan otras células inmunes (Li, 2003).

3.3.1 Mecanismos de acción: Fagocitosis y Degranulación

Los patógenos son inmediatamente reconocidos por fagocitos en los tejidos conectivos sub-epiteliales con tres consecuencias: 1.- Los patógenos son atrapados, englobados y destruidos por macrófagos y neutrófilos. La respuesta se inicia con la identificación de los PAMP por los PRR, localizados en la superficie de los fagocitos. Los receptores median la fagocitosis y la liberación del patógeno en los lisosomas donde se procesa el antígeno. Los péptidos resultantes pueden ser presentados por moléculas del MHC en la superficie del macrófago. 2.- La interacción de los patógenos con los fagocitos induce la secreción de interleucinas. Algunos de los PRR, activan vías de transducción de señal que inducen la expresión de una gran variedad de genes de la respuesta inmune, donde se incluyen los genes para interleucinas inflamatorias y péptidos antimicrobianos. Los receptores TLR y sus vías de transducción de señales conducen a la activación de factores de transcripción de la familia del factor

nuclear kappa B (NF- κ B). La liberación de interleucinas también es inducida por pequeños péptidos liberados en la cascada del complemento. 3.- Los macrófagos funcionan como una célula presentadora de antígenos. Los receptores de macrófagos, tienen un papel importante en el procesamiento antigénico, así como en la transmisión de señales que inducen la expresión de moléculas coestimuladoras. De esta manera, los macrófagos al liberar ciertos tipos de interleucinas determinan la forma de la respuesta inmune (Ulevitch, 1995; Linehan, 2000; Kopp, 1999; Stein, 2000).

Los neutrófilos son la principal línea de defensa contra hongos ya que además de la fagocitosis liberan ROS y enzimas lisosomales para eliminar al patógeno (Bogdan, 2000). Cuando un fagocito actúa sobre un patógeno su consumo de oxígeno aumenta, a este evento se le denomina estallido oxidativo, y produce ROS con efectos antimicrobianos.

Los compuestos de oxígeno son tóxicos tanto para el patógeno como para la célula, por lo cual se retienen en compartimentos intracelulares. Este método de destruir microbios mediante el uso de moléculas portadoras de ROS recibe el nombre de destrucción intracelular dependiente de oxígeno.

El primer paso es la producción dependiente de oxígeno, el radical superóxido, que es una sustancia bactericida rica en oxígeno. El superóxido es transformado en presencia de peróxido de hidrógeno en oxígeno simple mediante una reacción catalizada por la enzima denominada superóxido dismutasa. Los radicales superóxido también reaccionan con radicales hidroxilo, que contribuyen a la destrucción del microbio invasor (Shatwell, 1996). El segundo paso implica el uso de la enzima mieloperoxidasa, presente en los gránulos de los neutrófilos (Klebanoff, 1999). Cuando los gránulos se fusionan con un fagosoma, se libera mieloperoxidasa al fagolisosoma, y esta enzima utiliza peróxido de hidrógeno y cloro para generar hipoclorito. El hipoclorito es extremadamente tóxico para las bacterias (Fang, 2004).

Los fagocitos eliminan microbios mediante cuatro métodos independientes de oxígeno pero que involucra la participación de las moléculas de sus gránulos. 1.- Utiliza proteínas con carga eléctrica que dañan la membrana bacteriana. 2.- Participación de lisozimas; estas enzimas destruyen la pared celular bacteriana. 3.-La acción de la lactoferrinas presentes en los gránulos de los neutrófilos que extraen el hierro del medio, metal que es esencial para las bacterias. 4.- las proteasas y enzimas hidrolíticas, que actúan digiriendo las proteínas de bacterias destruidas (Hoffbrand, 2006)

3.3.2 Neutrófilos: Origen y desarrollo celular

Los neutrófilos son células maduras, provenientes de células madre CD34. Un impresionante número de neutrófilos se liberan de la médula ósea a la circulación, la regulación de las células por lo tanto debe estar bajo estricto control y esto se explica por el hecho de que los neutrófilos son sometidos a la apoptosis espontánea y a la participación activa y constante en la defensa contra infecciones (Fig 7), (Binet, 2009).

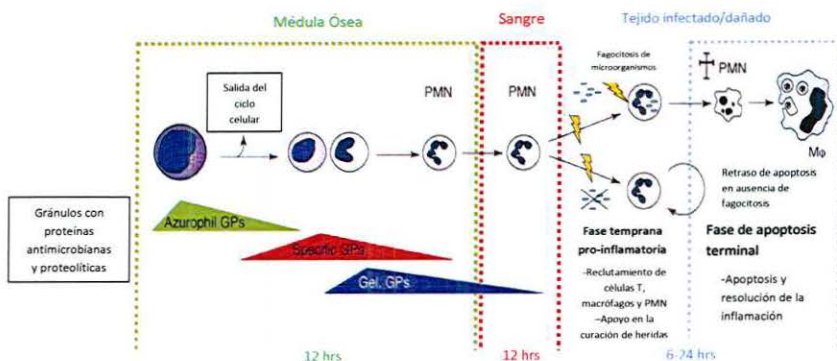


Figura 7.- Ciclo de vida de los neutrófilos. Desarrollo en médula ósea, circulación en sangre y participación en tejido infectado, terminando en apoptosis (Modificado de Binet, 2009).

Los neutrófilos humanos contienen dos tipos básicos de gránulos, azurofilicos y específicos, que difieren en su morfología, contenido y tiempo de origen.

Los gránulos azurofilicos son grandes y pueden ser de forma esférica, este último con una inclusión cristalina. Se producen en la fase secretora, primero (promielocito), contienen peroxidasa y diversas enzimas lisosomales, y por lo tanto corresponden a los lisosomas primarios modificados. Por su parte los gránulos específicos son más pequeños, pueden ser de forma esférica o alargada, y se forman durante una etapa secretora después (mielocitos). Carecen de enzimas lisosomales y contienen fosfatasa alcalina; sus contenidos permanecen en gran medida sin determinar, cuando están maduros, su núcleo presenta cromatina compacta multilobulada de dos a cinco lóbulos por lo que se les llama también leucocitos polimorfonucleares (PMN) (Bainton, 1971).

Son una parte esencial del sistema inmune innato y se acumulan rápidamente en los sitios de infección y lesión, fagocitando y degranulando moléculas bactericidas. Se han relacionado con la coagulación de la sangre, en propósito para restringir difusión microbiana durante la infección, atraída por moléculas secretadas por células y tejidos dañados. (Fig 8), (Segal, 2005).

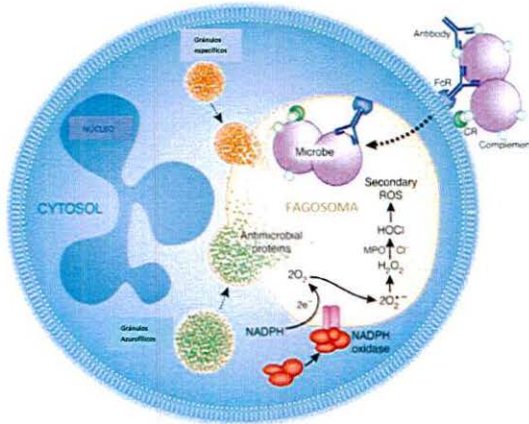


Figura 8.- Estructura molecular interna del PMN. En acción con en el fagosoma el estallido oxidativo y la participación de los gránulos proteolíticos (Modificado de Binet, 2009).

3.4 Infecciones por Hongos Patógenos

Los hongos para el humano representan un pequeño grupo de todas las levaduras y mohos presentes en el ambiente. Se estima que hay aproximadamente alrededor de 1,5 millones de especies de hongos en el ambiente, de los cuales, solo aproximadamente 100 especies se consideran patógenas para el humano (Hawksworth, 2001).

Estos hongos pueden ser adquiridos por varias rutas entre las que se encuentran la inhalación de esporas y el contacto directo en la piel. Los hongos comensales pueden establecer infecciones dañando las barreras epiteliales o modificando la flora bacteriana del hospedero. El espectro de las infecciones fúngicas varía de las micosis superficiales hasta enfermedades alérgicas (Cuadro I), (Hohl, 2006).

Organismo	Enfermedad
<i>Candida albicans</i>	Mucositis, dermatitis y vulvovaginitis; enfermedad sistémica en hospederos inmunocomprometidos
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Neumonía y meningitis, usualmente en hospederos inmunocomprometidos
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Neumonía y enfermedad sistémica en hospederos inmunocomprometidos
<i>Blastomyces dermatidis</i>	Infección cutánea y neumonía
<i>Coccidioides immitis</i> , <i>C. posadasii</i>	Neumonía, osteomielitis y meningitis
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Neumonía, mucositis e infección cutánea; enfermedad sistémica en hospederos inmunocomprometidos
<i>Pneumocystis carinii</i>	Neumonía en hospederos inmunocomprometidos
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Neumonía y enfermedad sistémica en hospederos inmunocomprometidos
<i>Fusarium solani</i>	Similar a <i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Rhizopus oryzae</i>	Infecciones mucosas y pulmonares en hospederos inmunocomprometidos
<i>Pseudallescheria boydii</i>	Infecciones de la piel y tejidos suaves en hospederos inmunocomprometidos
<i>Trichophyton rubrum</i>	Dermatitis, pié de atleta y onicomicosis

Cuadro I.- Infecciones por hongos patógenos. Organismo causal y enfermedad (Hohl, 2006).

3.4.1 Las Dermatofitosis

Las dermatofitosis son micosis superficiales producidas por hongos filamentosos llamados dermatofitos, los cuales afectan el estrato corneo epidérmico debido a que son hongos queratinolíticos. Los tres géneros que afectan al hombre son: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*. La dermatofitosis causada por *Trichophyton rubrum* es la más frecuente en el mundo, además este patógeno es responsable de algunas dermatofitosis crónicas (Méndez, 2004).

Como se mencionó, en México se encuentran dentro de las diez dermatofitosis más frecuentes, constituyendo hasta un 80% de todas las micosis y tienen una frecuencia del 5% en la consulta dermatológica. Las formas clínicas se clasifican de acuerdo con la región del cuerpo que suelen afectar. La tiña de los pies es la tiña más común, con una frecuencia de 30 a 45%, donde la relación por sexo M/F es 6:4. Este tipo de tiña se presenta dentro de la tercera y la sexta década de vida y en el 85% de los casos el agente etiológico es *T. rubrum* (Bonifaz, 2000).

Algunas de las lesiones de los pacientes que sufren estas dermatofitosis, pueden originar infecciones más profundas con supuración al ser infectadas por bacterias, además de funcionar como un reservorio de infección, por lo que se considera un problema de salud pública.

Las condiciones locales que ayudan a la progresión de la enfermedad son la humedad, la seborrea, la falta de higiene y una mayor temperatura de la piel. En algunas personas pueden originar una reacción inflamatoria, el SI del individuo es muy importante en la intensidad de esta infección. Tiende a ser más intensa en los diabéticos, cancerosos, inmunodeficientes y aquellos con niveles elevados de corticoides (Rugeles, 2001).

3.4.1 Respuesta inmune innata contra hongos patógenos

El papel instructivo del sistema inmune innato contra los hongos ocurre mediante la restricción del crecimiento del hongo, la expresión de moléculas coestimuladoras en las células fagocíticas y la producción de citoquinas y quimiocinas. La liberación local de estas moléculas efectoras regula el tráfico de varios tipos de leucocitos, iniciando así la respuesta inflamatoria, la activación de los fagocitos a un estado microbicida y dirigiendo el desarrollo de las células T cooperadoras (Fig 9), (Hohl, 2006; Romani, 2004).

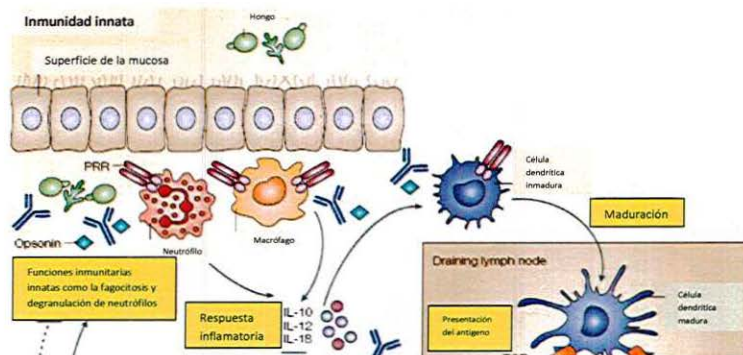


Figura 9.- Mecanismos de Inmunidad innata contra hongos patógenos. La mayoría de hongos patógenos son detectados y eliminados por la RII (Modificado de Romani, 2004).

3.4.2 *Trichophyton rubrum* y la Inmunidad innata

El hongo de la especie *Trichophyton rubrum* es el agente más común de las dermatofitosis: tinea pedis, tinea corporis y onicomicosis. *T. rubrum* al interactuar con los queratinocitos los estimula para iniciar la respuesta inmune. Estos mecanismos tienen dos propósitos principales, primero, la generación de una actividad anti fúngica directa que elimine al hongo y segundo, la inducción de una respuesta adaptativa. La mayoría de los mecanismos son inducidos después de la infección y por lo tanto su activación requiere que los PAMP sean reconocidos. La pared celular de los hongos es compleja y está constituida por

gran variedad de moléculas, incluyendo glucanos, quitina y mannoпротеínas entre otras, las cuales son reconocidos por los TLR (Willment, 2008; Roeder, 2004).

Se conoce muy poco acerca de la inmunología de las dermatofitosis. La identificación de los mecanismos que inducen el control o que permiten el establecimiento de la enfermedad es un punto de mucho interés, sobre todo delineando los posibles mecanismos de evasión que *T. rubrum* pudo haber desarrollado. Varios autores han reportado la liberación de IL-8 por los queratinocitos en presencia de antígenos de dermatofitos, como la tricofitina, sugiriendo que estas células pueden contribuir a la inducción de una respuesta aguda durante la infección (Almeida, 2008).

La producción de IL-8 por los queratinocitos induce la acumulación de neutrófilos en el estrato córneo, sugiriendo que los queratinocitos no sólo tienen un papel estructural importante en la formación de la barrera física, sino también tienen una importante función como iniciadores de la reacción inflamatoria en la piel. Se ha publicado que los neutrófilos que llegan al sitio de infección son altamente tóxicos contra *Trichophyton rubrum* (Calderón, 1987).

También se ha descrito la capacidad de los macrófagos para fagocitar las conidias de *T. rubrum*, sin embargo este proceso se bloquea con la adición de mananos de la pared celular del hongo. Además, se ha observado que los macrófagos que ingieren las conidias disminuyen la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD54, y producen cantidades importantes de IL-10 y TNF, pero no producen IL-12 ni óxido nítrico (Campos, 2006). Nuestro grupo de investigación realizó un trabajo experimental con la especie de *Trichophyton rubrum* y su extracto de conidias en interacción con queratinocitos primarios de cultivo *in vitro*, obteniendo como resultados por medio de citometría de flujo, que el extracto de conidias de *T. rubrum* estimula a las células para que proliferen y se diferencien en queratinocitos y estas células también expresan moléculas como TLR 2, TLR 6 y Betadefensinas-2 respondiendo como una auténtica célula inmune, además que los queratinocitos no son dañados (Islas, 2007; García, 2011).

3.5 Trampas extracelulares de neutrófilos (NET): Estructura y función

Se han realizado investigaciones recientes acerca de los neutrófilos que revelan un mecanismo de defensa llamado trampas extracelulares de neutrófilos (NET). Como se mencionó constituyen una red de fibras de DNA con partículas accesorias, como las histonas, los péptidos antimicrobianos, enzimas, plaquetas, fibras de colágeno, que en conjunto forman un "coctel letal", que sirve de andamio o soporte para provocar la respuesta inflamatoria y tiene como función atrapar y matar a los microbios y así evitar la infección (Brinkmann, 2004).

Se conocen tres estrategias utilizadas por los neutrófilos para eliminar a los microorganismos: 1) La fagocitosis, y subsiguiente la eliminación del patógeno exponiéndolo a un estallido oxidativo y a compuestos antimicrobianos que son descargados en las vacuolas fagocíticas por gránulos citoplasmáticos. 2) La degranulación, que implica la liberación de sustancias antimicrobianas en el sitio de infección, y 3) la recientemente descrita liberación de estructuras en red de DNA y proteínas microbicidas al espacio extracelular. Estos operan en escalas de tiempo diferentes, y tienen diferentes efectos sobre las células (Fig 10).

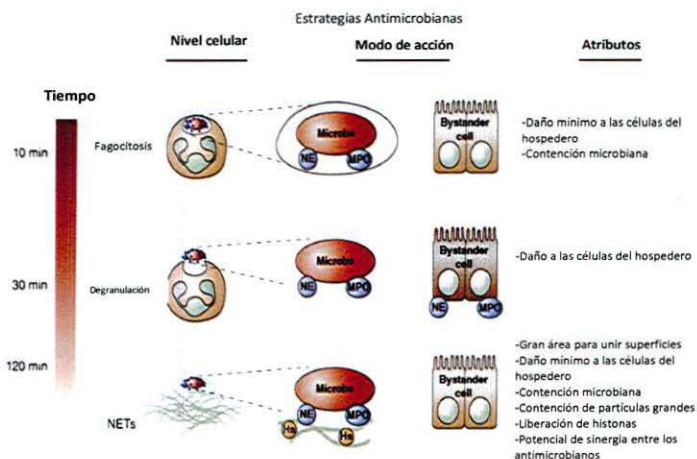


Figura 10.- Estrategias antimicrobianas de los neutrófilos (Modificado de Papayannopoulos, 2007).

La ingestión de microbios en un fagolisosoma minimiza el daño a las células hospederas durante la fagocitosis, mientras que la degranulación difunde proteasas granulares y pueden causar importantes daños. Las NET representan una estrategia de defensa para evitar la proliferación microbiana, concentrando la acción de los microbicidas y promoviendo su sinergismo, los microbios quedan atrapados en estas redes extracelulares (Segal, 2005; Brinkmann, 2004).

El DNA es el principal componente de las NET, dado que el tratamiento con DNAsas mostró como resultado la desintegración de las NET (Buchanan, 2006). En estas redes se encuentran factores antimicrobianos liberados durante la degranulación de los neutrófilos, como la mieloperoxidasa (MPO), la elastasa del neutrófilo (NE), proteinasa 3 (PR3), catepsina G, lactoferrina, triptasa y gelatinasa, entre otros (Papayannopoulos, 2010).

Las NET liberan histonas al espacio extracelular en abundancia, las cuales constituyen agentes antimicrobianos efectivos que promueven la lisis bacteriana. (Fig 11), (Yousefi, 2008; Von Kockritz, 2008).

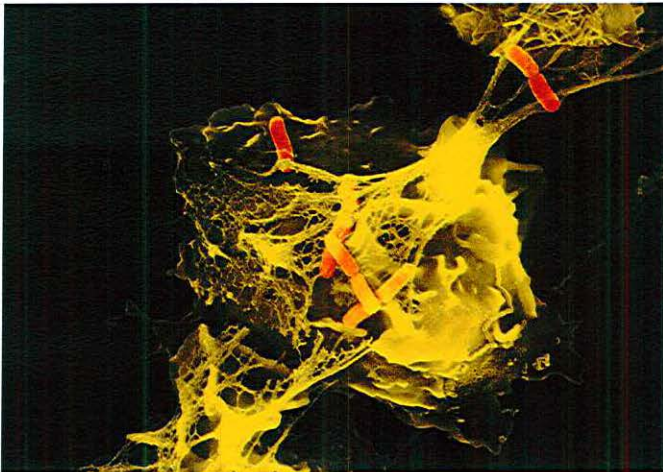


Figura 11.- Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NET). NET atrapando bacterias en el espacio extracelular (Brinkmann,2007).

Las NET atrapan y eliminan una amplia variedad de patógenos, que incluyen bacterias, protozoarios y hongos entre los que se encuentran: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Shigella flexeneri*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans* y *Leishmania amazonensis* (Brinkmann, 2007; Urban, 2006; Guimarães, 2009; Ramos, 2009).

Pueden eliminar microorganismos de mayor tamaño como las hifas de los hongos, las cuales resultan grandes para ser eliminadas mediante la fagocitosis, constituyen una barrera física, lo que permite reducir el daño causado por los microbicidas a los tejidos circundantes (Nauseef, 2007; Bianchi, 2009).

3.5.1. Formación y liberación de las NET

La formación de NET se activa en respuesta a estímulos como a lipopolisacáridos bacterianos (LPS), IL-8 y miristato de forbol (PMA), también por bacterias, hongos y protozoos (Cuadro II), (Blickwede, 2009).

Factor o microbio	Origen celular de las NET
Interleucina 8	Neutrófilos
Lipopolisacáridos (LPS)	Neutrófilos
Miristato de forbol (PMA)	Neutrófilos, mastocitos
Peróxido de sodio	Neutrófilos, mastocitos
Plaqueta TLR-4	Neutrófilos
Interferón γ + C5a	Neutrófilos, eosinófilos
Interferón γ + LPS	Eosinófilos
Interferón γ + eotaxina	Eosinófilos
IL-5 + LPS/C5a/eotaxina	Eosinófilos
Interferón α + C5a	Neutrófilos
GM-CSF + C5a	Neutrófilos
<i>Staphylococcus aureus</i>	Neutrófilos, mastocitos
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Neutrófilos, mastocitos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mastocitos
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Neutrófilos
<i>Mycobacterium canettii</i>	Neutrófilos
<i>Candida albicans</i> (hifas o yemas)	Neutrófilos
<i>Escherichia coli</i>	Neutrófilos
<i>Leishmania amazonensis</i>	Neutrófilos

Cuadro II.- Factores físicos, químicos y microbianos que inducen NET (Modificado de Blickwede, 2009).

Algunos neutrófilos desarrollan un mecanismo de muerte celular, diferente de la apoptosis y la necrosis llamado "NETosis", este mecanismo implica la disolución de la membrana nuclear y de las membranas granulares, y la desfragmentación de la cromatina en el citoplasma, el contenido granular antimicrobiano y la cromatina se mezclan, luego de la ruptura de la membrana plasmática hay liberación al espacio extracelular de proteínas antimicrobianas ancladas a una red de cromatina. Este proceso lleva unas 2 o 3 h. (Fuchs, 2007).

La liberación de NET no solo es activada por los patógenos y sus componentes, sino también por plaquetas activadas con LPS. Las plaquetas pueden inducir NET por la activación de neutrófilos vía TLR-4 (receptor tipo Toll 4), (Fig 12), (Clarck, 2007).

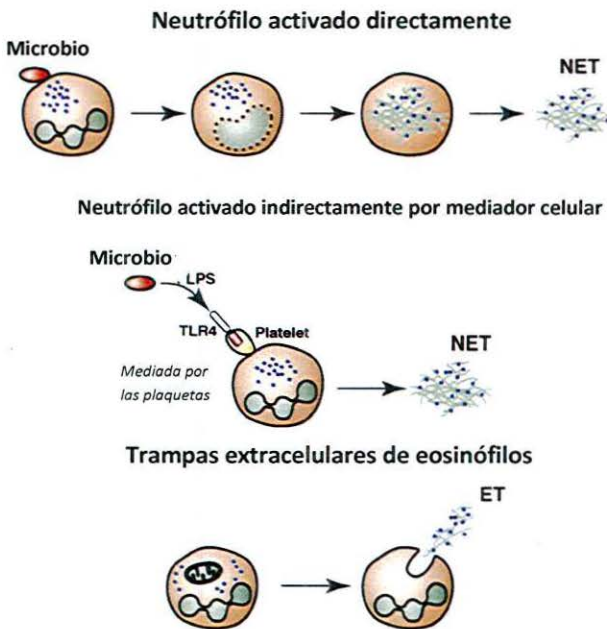


Figura 12.- Mecanismos que activan y liberan NET. Activación directa y activación indirecta de neutrófilos y trampas de eosinófilos (Modificado de Papayannopoulos, 2007).

Los neutrófilos incubados *in vitro* con factor estimulante de colonias granulomonocíticas (GM-CSF), más la estimulación con el componente del complemento C5a son capaces de liberar NET compuestas de DNA mitocondrial. Estas NET carecen de histonas e indican que la generación de NET no siempre involucra muerte celular. La liberación de DNA mitocondrial al espacio extracelular activa a los neutrófilos, actuando como un ligando para el receptor TLR-9. Se ha demostrado que los eosinófilos son capaces de liberar estructuras parecidas a las NET compuestas por DNA mitocondrial y proteínas granulares (Fig 12), (Zhang, 2010; Yousefi, 2008).

La producción de ROS por la NADPH oxidasa desempeña un papel central. La inhibición farmacológica del estallido respiratorio luego del tratamiento de neutrófilos con Difeniliodonio inhibidor de la NADPH oxidasa perjudica la formación de NET. Los neutrófilos aislados de pacientes con la enfermedad granulomatosa crónica (EGC) son deficientes en la formación de NET. Los receptores tipo Toll entre otros pueden inducir este mecanismo, activando a la Proteína Kinasa C (PKC), ésta se encarga de mandar una red de señales para formar NADPH oxidasa, la estimulación realiza cambios en los organelos de la célula ya mencionados, este proceso de muerte celular depende de la generación de ROS por la NADPH oxidasa (Fig 13), (Brinkmann, 2007; Papayanopoulos, 2009; Fuchs, 2007; Clarck, 1978).

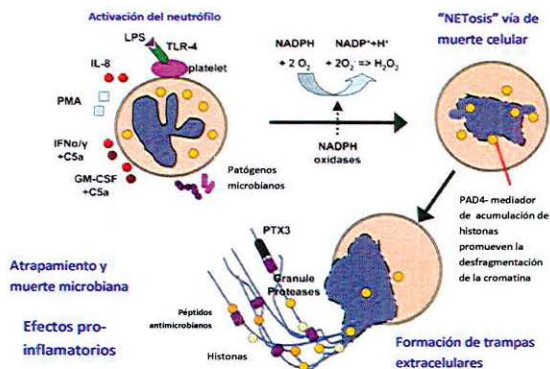


Figura 13.- Efecto molecular para la formación y liberación de NET (Modificado de Blickwede, 2009).

Se propuso un modelo que demuestra que el estallido oxidativo induce la liberación de NE y de MPO de los gránulos azurófilos. La NE se transloca hacia el núcleo, donde se encarga de fragmentar y disociar a las histonas y a sí promover la decondensación de la cromatina, mientras que la MPO colabora sinérgicamente con la NE en las etapas finales del proceso de desfragmentación del DNA (Fig 14) (Papayanopoulos, 2010).

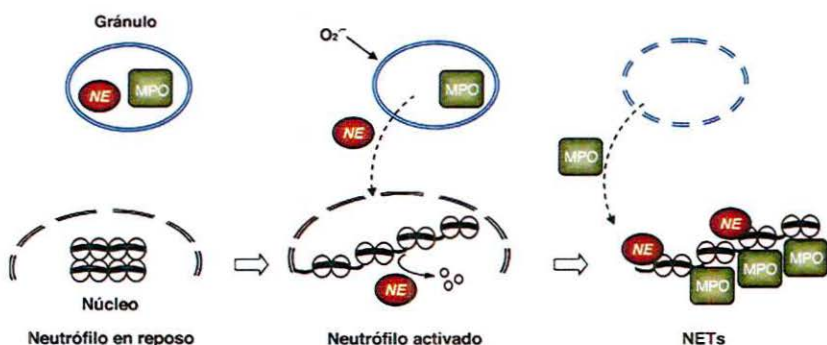


Figura 14.- Modelo molecular de la participación de la NE y MPO en la formación de NET (Camisia, 2012).

Estudios recientes sugieren que la formación de NET puede tener lugar de forma independiente de ROS. La estimulación de neutrófilos EGC con ligandos CCR2 induce la formación de NET de manera independiente de la actividad de la NADPH oxidasa e involucrando cinasas de la familia Src (Marcos, 2010).

Algunas bacterias logran escapar de las NET desarrollando estrategias basadas en la degradación de la red de DNA mediante la síntesis de DNAsas. Se ha demostrado que la expresión de la DNasa Sda1 por *S. pyogenes* es un atributo de virulencia importante, dado que las cepas deficientes en Sda1 son *in vitro* más sensibles a las NET. La transformación de *Lactococcus lactis* con un plásmido portador del gen que codifica para Sda1 aumenta la resistencia bacteriana a la destrucción extracelular mediada por NET (Buchanan, 2006).

El hecho de que las DNAsas requieran cationes divalentes como Ca y Mg para su actividad, provee un potencial punto de ataque por parte del hospedador. Se ha descrito que las proteínas quelantes de calcio y cinc S100 se encuentran presentes en altas concentraciones en los sitios de infección. Es probable, que la capacidad de unir Ca de algunas proteínas como S100, anexinas y otras, protejan las NET de las DNAsas bacterianas, limitando la disponibilidad de cationes divalentes y, la actividad de las DNAsas (Corbin, 2008).

Las bacterias utilizan catalasas para inhibir la formación de NET dependiente de ROS. Se ha descrito que la inhibición de las catalasas incrementa la formación de NET. Resulta probable que los microbios empleen catalasas para evitar ser atrapados por las NET. Algunas bacterias pueden esconderse en "biopelículas" como un mecanismo de resistencia a los microbicidas contenidos en las redes de DNA (Fuchs, 2007; Hong, 2009).

Finalmente, la modificación de la superficie bacteriana sería otra de las estrategias empleadas por las bacterias para evadir las NET. Se cree que la unión de las NET a los patógenos está dada a través de interacciones electrostáticas entre las superficies aniónicas microbianas y las proteínas catiónicas incrustadas en las NET.

En este sentido, la expresión de ciertos genes involucrados en el ensamblado de la cápsula bacteriana de *S. pneumoniae* disminuye la unión a las NET. El operón *dlt* de *S. pneumoniae* introduce carga positiva en la pared celular con la incorporación de residuos de D-alanina en el ácido lipoteicoico. Si bien la inactivación del *dltA* no afecta la unión bacteriana a las NET, se observó que, al inactivar *dltA* hay ausencia de cápsula y aumenta la muerte bacteriana mediada por NET, sugiriendo que un cambio en la carga de superficie permitiría la penetración de los antimicrobianos incluidos en las NET (Fig 15), (Wartha, 2007).

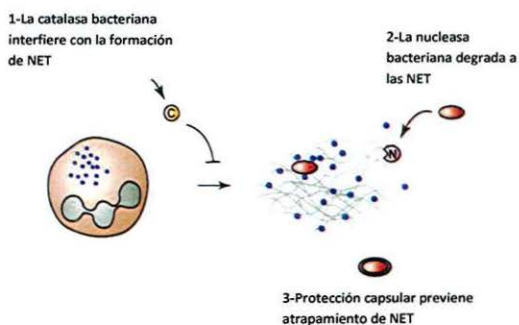


Figura 15.- Mecanismos bacterianos de evasión de NET. Uso de enzimas que degradan el DNA (Modificado de Papayannopoulos, 2007).

3.5.2 Las NET y su relación con las enfermedades.

Cualquier proceso fisiológico necesita ser controlado por mecanismos estrictos. Sin regulación, todo proceso fisiológico puede tener consecuencias patológicas serias. Las NET no son una excepción.

Las NET resultan importantes como agentes antimicrobianos en la respuesta inmune innata, pero los altos niveles de NET en la circulación sanguínea pueden resultar en una patología, hay evidencia en la investigación que demuestra que las NET desempeñan un papel importante en varias enfermedades infecciosas, así como enfermedades no infecciosas generando, por ejemplo, trombos en capilares, deterioro de la circulación y daño tisular en el hospedero (Cuadro III), (Fuchs, 2010).

Patógeno causal de enfermedades infecciosas	Papel de las tramapas extracelulares
<i>Staphylococcus aureus</i>	Capturan y matan al patógeno
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Capturan y matan al patógeno
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Capturan y previenen la expansión bacteriana
<i>Salmonella enterica</i>	Capturan y matan al patógeno
<i>Shigella flexneri</i>	Capturan y matan al patógeno
<i>Escherichia coli</i>	Capturan y matan al patógeno
<i>Candida albicans</i>	Capturan y matan las hifas o yemas
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Capturan a la bacteria
<i>Mycobacterium canettii</i>	Capturan a la bacteria
<i>Leisteria monocytogenes</i>	Capturan y matan al patógeno
<i>Haemophilus influenzae</i>	Formación de "biopelículas" y persistencia
<i>Photorhabdus luminescens</i>	Poco claro
<i>Plasmodium falciparum</i>	Poco claro
<i>Leishmania amazonensis</i>	Capturan y matan al parásito
Sépsis bacteriana	Después de activación plaquetaria causan daño endotelial
Enfermedades no infecciosas	
Apendicitis	Poco claro
Preclampsia humana	Poco claro
Enfermedades autoinmunes	Poco claro

Cuadro III.- Relación de NET con las enfermedades (Modificado de Blickwede, 2009).

En ciertos pacientes con enfermedades autoinmunes como Lupus Eritematoso Sistémico (LES), se producen grandes cantidades de auto-anticuerpos contra DNA de doble cadena, contra histonas y contra MPO. Estas moléculas son abundantes en las NET y se cree que estas NET podrían tener un papel en el desarrollo de alguna de estas enfermedades autoinmunes. En los pacientes con LES los auto-anticuerpos activan neutrófilos, promoviendo la liberación de NET, estas NET activan células dendríticas y liberan TNF- α desarrollando inflamación exagerada conduciendo a la enfermedad (Cabral, 1998; Bosch, 2011).

Ciertos pacientes con LES muestran una degradación lenta de las NET *in vitro*, posiblemente debido a la presencia de inhibidores de DNAsas propias o anticuerpos que protegen a las NET. Aquellos pacientes que presentan una alteración en la degradación de las NET desarrollan nefritis lúpica (Hakkim, 2010).

La disrupción del mecanismo de limpieza de NET se encuentra asociado con la autoinmunidad. Se han descrito mutaciones en el locus de la DNAsa I humana en cortes de pacientes con LES, y más recientemente se ha encontrado una asociación entre un polimorfismo de un solo nucleótido en la DNAsa I y la susceptibilidad al LES en un estudio realizado en la población española. Por lo tanto, la DNAsa I humana desempeña un papel en la remoción de las NET. En tal caso, mutaciones en el gen que codifica para la DNAsa podrían conducir a la persistencia de NET, seguido de un episodio de infección, y tal vez incrementar las oportunidades de iniciar auto-inmunidad (Yasutomo, 2001; Bodaño, 2006).

Se ha descrito una correlación entre un incremento en la producción de anticuerpos antinucleares y un aumento en el nivel de DNA extracelular en sangre en niños infectados con *Plasmodium falciparum*. La formación de NET y la producción de auto-anticuerpos antinucleares contra DNA sugieren que en los niños infectados los mecanismos autoinmunes podrían inducir patología (Backer, 2008).

Queda mucho por descifrar asociado a las NET y el desarrollo de enfermedades; sin embargo, la excesiva formación de NET o su persistencia desempeñarían un papel fundamental en algunas enfermedades autoinmunes. No está claro si la disfunción pulmonar grave u otras enfermedades en conjunto con infecciones virales podrían ser debido a las NET como consecuencia de la respuesta inflamatoria (Desloges, 2008; Zhou, 2008).

Las NET participan en la fibrosis quística previniendo el movimiento ciliar y mediante oclusión de los capilares pulmonares. Se consideraba que las células necróticas contribuían a la fuente de DNA libre encontrado en los pulmones de los pacientes con fibrosis quística. Sin embargo, este concepto cambió con el descubrimiento de las NET.

Se ha demostrado que muestras de pacientes con fibrosis quística contienen dos tipos de elementos NETóticos: las fibras de DNA y regiones globulares (MPO y NE positivas). Las fibras de DNA forman una red tridimensional, las zonas globulares están adheridas a esta malla. Esta red viscosa es capaz de atrapar todo tipo de componentes del esputo (glóbulos, células apoptóticas, bacterias, etc.). Por lo tanto, ha quedado demostrada la naturaleza de las flemas de pacientes con fibrosis quística al definir que las NET representan el mayor componente extracelular (Manzenreiter, 2012).

Se comprobó la formación de microtrombos en pulmón después de la infusión de histonas en un modelo de sepsis en ratón. Las histonas extracelulares liberadas en respuesta a la inflamación contribuyen con la disfunción endotelial, fallo de órganos y muerte (Xu, 2009).

Las NET también proveen una plataforma y un estímulo para la formación de trombos. Las NET son capaces de inducir adhesión, activación y agregación plaquetaria, elementos esenciales para la formación de trombos. Por ello, se propone que las NET representarían una conexión entre la inflamación y la trombosis, la cual podría explicar la asociación epidemiológica entre la infección y la trombosis (Fuchs, 2010).

4. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones fúngicas más frecuentes entre la población son las dermatofitosis o tiñas. En México es un problema que se presenta entre el 70 y 80% de todas las micosis. Por tener una frecuencia muy elevada como infección en distintas partes del cuerpo se cree que este tipo de patógeno ha desarrollado modos de supervivencia para escapar de los mecanismos de defensa del hospedero, como consecuencia se expresa la enfermedad con síntomas molestos e incómodos para el paciente.

Trichophyton rubrum es un agente patógeno que afecta principalmente a los queratinocitos, alimentándose de queratina, la cual es un nutriente necesario para que se desarrolle, causando una de las micosis más comunes en el humano; la tiña y el pie de atleta entre otras. Este parásito muestra ser rebelde a los tratamientos, ya que ha desarrollado mecanismos de resistencia y evasión.

Las NET se relacionan con muchas enfermedades infecciosas y no infecciosas, han demostrado afinidad por microorganismos patógenos, ya que poseen una diversidad de moléculas antimicrobianas, pero no se ha demostrado aún el efecto que pueden generar las conidias completas de *Trichophyton rubrum* y el extracto sonificado de estas mismas con la formación de NET.

5. OBJETIVO GENERAL

Inducir *in vitro* trampas extracelulares de neutrófilos (NET) con *Trichophyton rubrum*.

5.1 Objetivos Particulares

- 1) Aislar el microorganismo patógeno de paciente diagnosticado con *Tiña* por el agente infeccioso *Trichophyton rubrum*.
- 2) Mantener la viabilidad del cultivo de *Trichophyton rubrum*.
- 3) Obtener el extracto de conidias completas de *Trichophyton rubrum*.
- 4) Homogenar las conidias de *Trichophyton rubrum* para obtener extracto sonificado de conidias.
- 5) Aislar y cultivar neutrófilos de sangre periférica humana.
- 6) Inducir la formación de las redes de DNA de los neutrófilos con distintos controles, negativo sin estímulo, positivo con PMA y las condiciones experimentales que son las conidias completas y el extracto de conidias de *T. rubrum*).

6. HIPOTESIS

“Los neutrófilos formarán *in vitro* NET en presencia del estímulo de las conidias completas de *Trichophyton rubrum* de la misma forma que el extracto sonicado de las conidias”.

7. METODOLOGÍA

Diagrama de flujo para el aislamiento y cultivo de *Trichophyton rubrum*, la extracción de conidias completas y sonicado de conidias

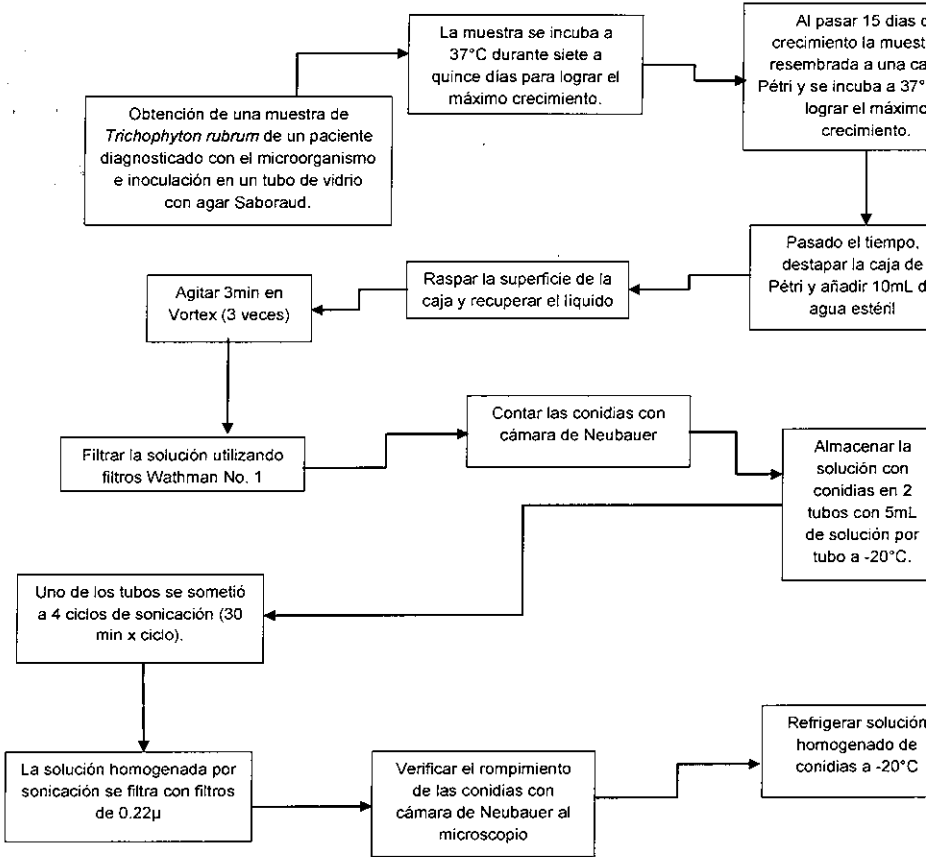


Diagrama de flujo para el aislamiento y cultivo de neutrófilos de sangre periférica humana por doble gradiente de densidad (Ficoll y Percoll)

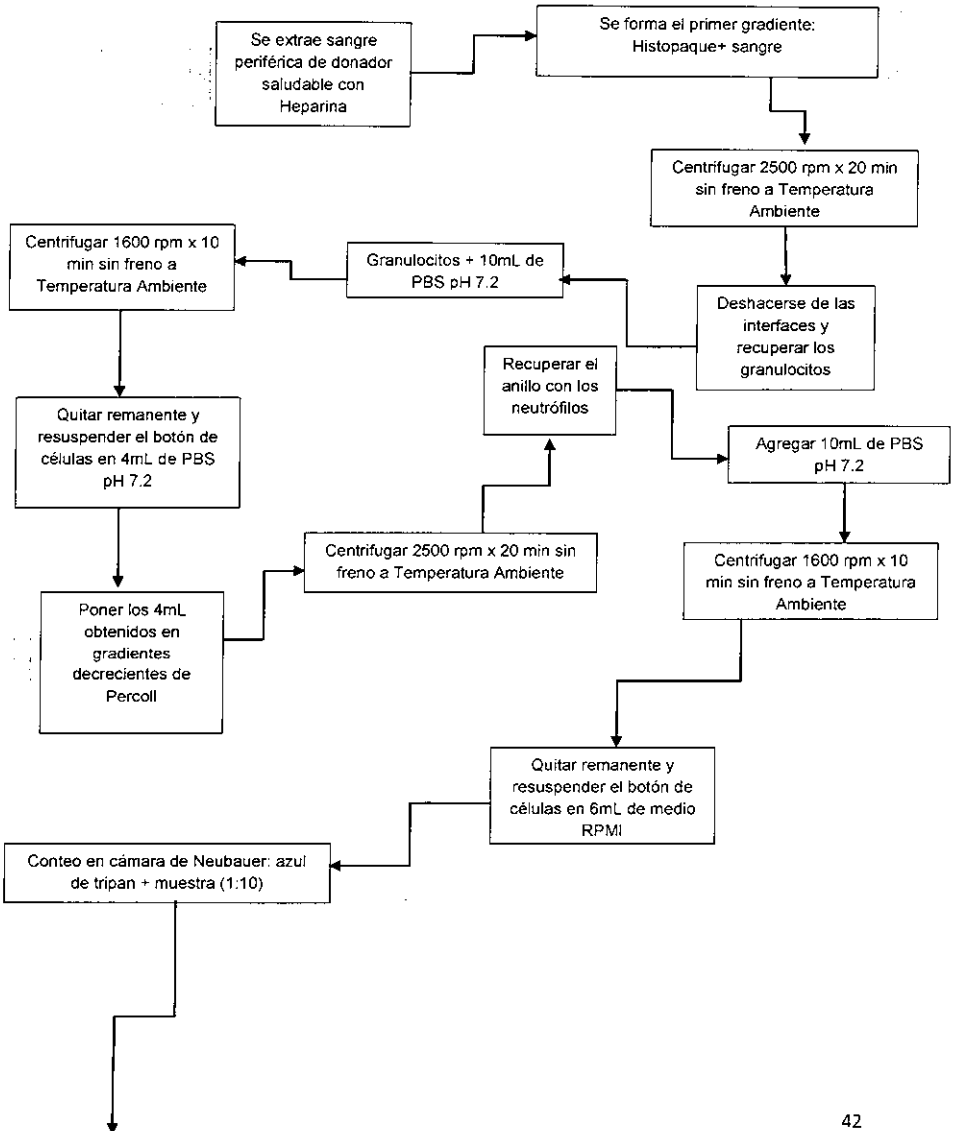
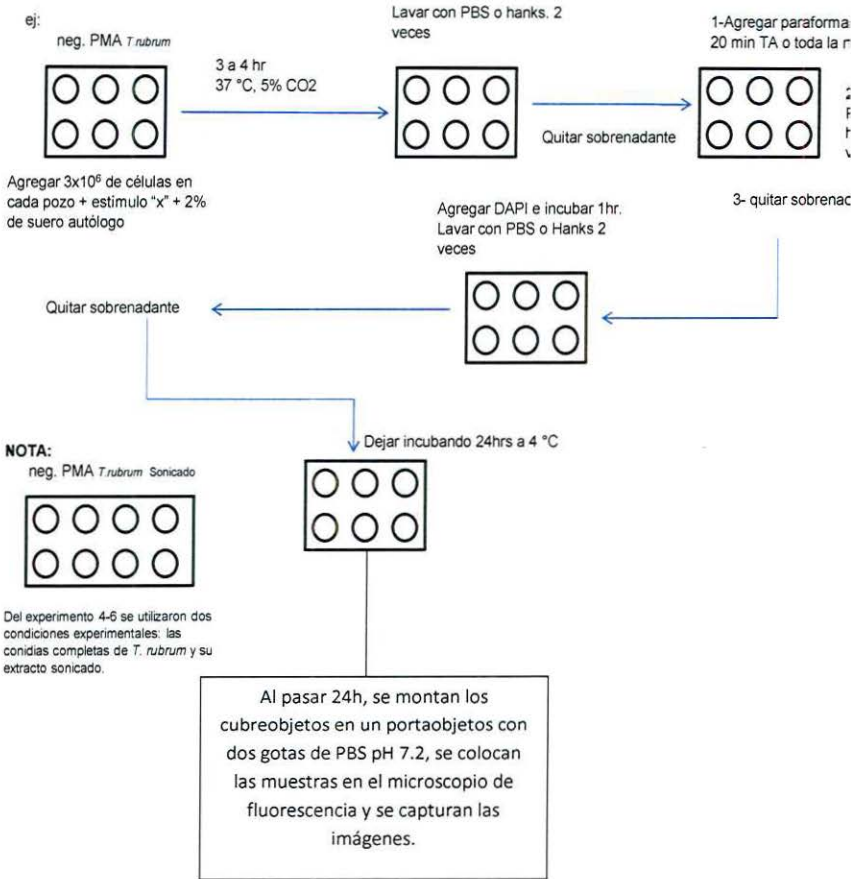


Diagrama: metodología y diseño experimental para la inducción de NET



8. MATERIALES Y METODOS

8.1 Aislamiento y Cultivo de *T. rubrum* (Mayorga, 1995)

Se aisló la cepa del microorganismo: *Trichophyton rubrum* (Obtenida de manera directa de pacientes diagnosticados con dermatofitosis, cultivados en cajas de Pétri con medio Agar Saboraud).

Se tomó una porción de la cepa y se colocó dentro del tubo de vidrio que contiene el agar solidificado. Se incubó a 37°C por 24hrs (pasado este tiempo se dejaron incubando a temperatura ambiente de 7 a 15 días). Se introdujo el asa de nicromo con un recuadro de cintilla auto-adherible en el tubo con *Trichophyton rubrum*, se raspó y capturó una parte de las colonias.

La cinta se colocó en un porta objetos y se añadieron dos gotas del colorante azul de metileno, se le colocó el cubre objetos y se observó en el microscopio compuesto la identificación del microorganismo. Se inoculó la cepa de *T. rubrum* dentro de la caja de Pétri que contiene el agar solidificado.

Se rotularon las cajas de Pétri con el nombre de la cepa y se incubaron a 37°C por 24hrs, las cajas de Pétri se dejaron hasta su máximo crecimiento a temperatura ambiente.

8.2 Aislamiento de conidias de *T. rubrum*

Para el aislamiento de las conidias se agregaron 10mL de agua bidestilada estéril a una caja de cultivo con el microorganismo en su máximo crecimiento y se raspó la superficie del agar con una espátula. Se recuperó el líquido y se agitó durante 3 minutos en vortex tres veces para desprender las conidias. La suspensión fue purificada con filtros Wathman No.1 estériles. Las conidias se cuantificaron con una cámara de Neubauer obteniendo 7×10^5 conidias de *T. rubrum* en 1mL de agua. La solución de conidias se dividió en dos tubos de 15mL con un volumen de 5mL por tubo, un tubo fue refrigerado a -20°C y el segundo se colocó en un sonicador para romper a las conidias.

8.3 Homogenado de conidias de *T. rubrum*

Se utilizaron cuatro ciclos de sonicación de 30 minutos cada uno. La solución se filtró por una membrana de 0.22μ estéril. El rompimiento de las conidias se confirmó por visualización en el microscopio. La solución con el homogenado de conidias se refrigeró a -20°C .

8.4 Aislamiento y cultivo de Neutrófilos Polimorfonucleares a partir de sangre periférica humana (Aga, 2002).

Se obtuvieron 7mL de sangre periférica humana de donador clínicamente sano en tubos Vacutáiner con heparina, se preparó un tubo de 15mL con 7mL de HISTOPAQUE (Ficoll) para realizar el primer gradiente de densidad. Se vertieron lentamente los 7mL de sangre en el tubo con los 7mL de ficoll, cuidando de no romper el gradiente, se centrifugó a 2500rpm durante 20min, a temperatura ambiente.

Se desecharon las distintas fases: Plasma, Ficoll y mononucleares, se tomó la fase de granulocitos y se colocó en un tubo nuevo. Se añadieron 10mL de PBS pH 7.2 al tubo con los granulocitos y se mezcló por inversión, se centrifugó a 1600rpm durante 10min. Al término de la centrifugación, se desechó el sobrenadante y se añadieron 4mL de PBS, se resuspendieron las células. Esta solución se pasó lentamente al tubo que contiene 10mL de los gradientes de Percoll*. Se centrifugó a 2,500rpm durante 20min, a temperatura ambiente.

Se colectó el anillo de Polimorfonucleares y se añadió a un tubo nuevo, se le agregaron 10mL de PBS y se mezcló por inversión, se centrifugó a 1,600 rpm durante 10min, a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se le añadieron 6mL de medio RPMI, se resuspendieron las células.

Se cuantificaron las células en una cámara de Neubauer, concentración de 90µL de azul de Tripiano con 10µL de la muestra con las células.

*** Formulación del gradiente decreciente de Percoll**

Se preparó la solución para el gradiente de Percoll: 36mL de Percoll se mezclaron con 4mL de PBS 10%, para tener una solución al 100%. En un tubo nuevo de 15mL se añadieron 1.5mL de solución Hank's con 8.5mL de Percoll dejando una solución al 85%, se añadieron 2mL de solución de Hank's con 8mL de Percoll a otro tubo nuevo dejando la solución al 80%, en el siguiente tubo se colocaron 2.5mL de solución de Hank's con 7.5mL de Percoll dejando la solución al 75%, en el tubo siguiente se añadieron 3mL de solución de Hank's con 7mL de Percoll para quedar una solución al 70%, y al último tubo se agregaron 3.5mL de solución de Hank's con 6.5mL de Percoll para quedar al 65%. En un tubo nuevo de 15mL se agregaron 2mL de Percoll al 85%, lentamente al mismo tubo se añadieron 2mL de Percoll al 80%, 2mL de Percoll al 75%, 2mL de Percoll al 70% y por último 2mL de Percoll al 65% (se agregaron las soluciones lo más lentamente para evitar romper el gradiente).

8.5 Inducción de trampas extracelulares de neutrófilos (NET)

Se colocaron 6 cubre objetos redondos 5min en etanol al 70%, 5min en etanol al 100% y 5min en Poli-L-lisina solución 1:10, posteriormente se colocaron en la placa de 6 pozos (un cubre objetos por pozo). Se lavó con 1mL de PBS pH 7.2 por la periferia del pozo para quitar el exceso de Poli-L-lisina.

Se agregaron 3×10^6 de neutrófilos a cada pozo, 200 μ L de suero autólogo, dos pozos se dejaron como control negativo no recibieron estímulo (C-), dos se establecieron como control positivo (C+) con PMA en concentración de 1 μ g/1mL, y los últimos dos pozos fueron las condiciones experimentales y se estimularon con 7×10^3 conidias completas del hongo *T. rubrum* en 100 μ L de agua bidestilada cada uno. Se incubó la placa por 3hrs a 37°C con 5% de CO₂.

Transcurrido el tiempo de incubación se lavó cada pozo con 1mL de PBS para retirar el exceso de PMA y conidias. Se agregaron 500 μ L de paraformaldehído al 4% por pozo, se incubó durante 20min a temperatura ambiente. Después se lavó con 1mL de PBS cada pozo para retirar el exceso. Se añadieron 100 μ L de DAPI en concentración 1mg/1mL a cada pozo y se incubó por 1h a temperatura ambiente. Se lavó con 1mL de PBS cada pozo para retirar el exceso de DAPI, se incubó por 24h a 4°C.

Al día siguiente se colocaron dos gotas de PBS pH 7.2 en el porta objetos y se montaron los cubre objeto, se observaron las muestras en el microscopio de fluorescencia y se capturaron las imágenes.

9. RESULTADOS

9.1.- Aislamiento y Cultivo de *T. rubrum*

Se logró mantener la viabilidad (a) y máximo crecimiento de la cepa de *Trichophyton rubrum* (b) que se aisló de manera directa de un paciente (Fig 16).



a).- Cultivo en tubos de vidrio de *T. rubrum* en agar saboraud. **b).**- Viabilidad y máximo crecimiento de la cepa.

Fig. 16.- Viabilidad del cultivo. a) Primer crecimiento del hongo aislado de manera directa de paciente con la enfermedad b) Cajas de Pétri en diferentes etapas de crecimiento del hongo en medio agar saboraud.

9.2.- Aislamiento de conidias Completas de *T. Rubrum*

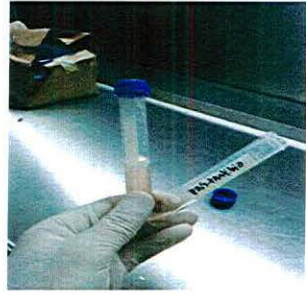
Se pudieron aislar las conidias completas de *T. rubrum* en agua destilada estéril, obteniendo una solución de 10mL con la cantidad de 7×10^5 conidias completas en 1mL de agua (Fig 17).

9.3.- Homogenado de conidias de *T. rubrum*

Cinco mL de la solución con conidias completas fueron destruidas por sonicación, obteniendo un extracto acuoso de restos de conidias. Ambas soluciones fueron utilizadas como condiciones experimentales (Fig 17).



a).- Obtención de conidias completas de *T. rubrum*.



b).- Filtración del extracto sonicado de conidias.

Fig. 17.- Aislamiento y sonicado de conidias a) Desprendimiento de las conidias por medio de Vórtex b) Obtención del extracto homogenado por sonicación de las conidias de *T. rubrum*.

9.4 Inducción de trampas extracelulares de neutrófilos (NET)

Después de aislar, cultivar y estimular a los neutrófilos humanos con los distintos controles y condiciones experimentales, se pudo observar, que los neutrófilos del primer duplicado, de cada uno de los 6 experimentos, correspondientes al Control negativo (C-) quedan intactos al no recibir estímulo, mientras que el duplicado de cada experimento con células que se estimularon con PMA, correspondientes al Control positivo (C+), mostraron al DNA liberado y desfragmentado. Además se puede observar que la célula pierde todas sus propiedades estructurales, liberando su material genético y citoplasmático al espacio extracelular en forma de red (NET). En los siguientes duplicados, correspondientes al estímulo de conidias completas y finalmente con homogenado de conidias, se observó igualmente la inducción y liberación del material genético, con la formación de las NET. (Ver Figuras 18 a la 23).

Experimento # 1

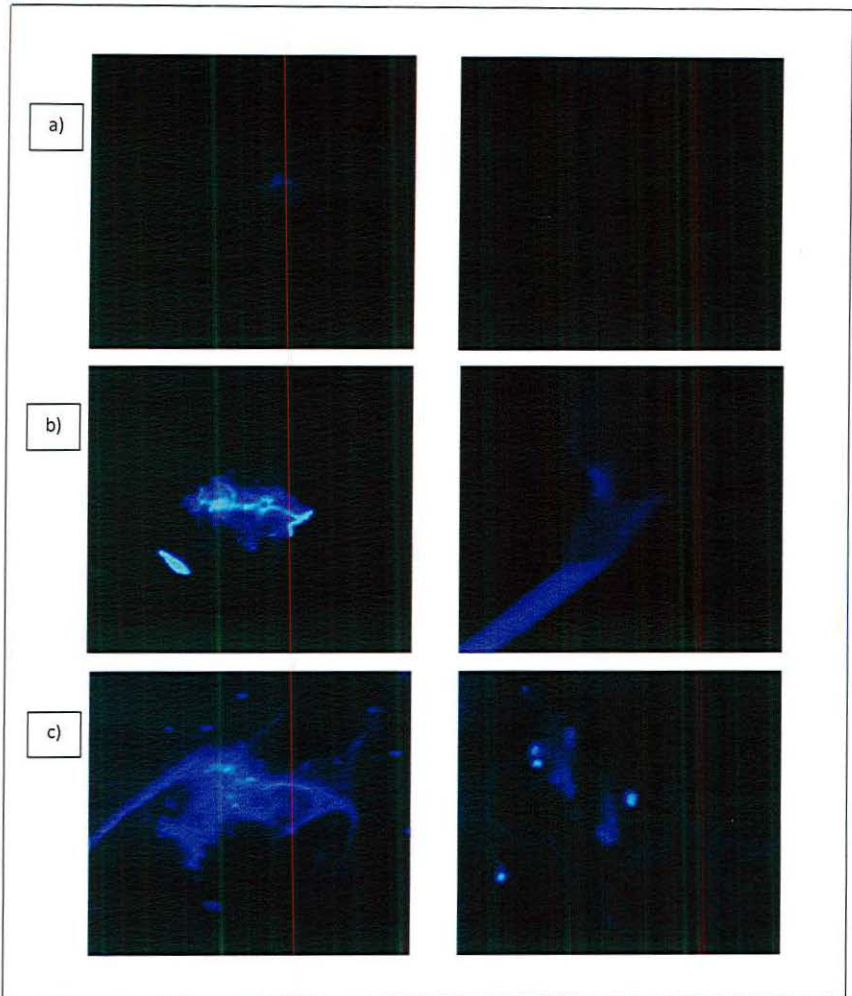


Fig. 18.- Inducción *in vitro* de NET con conidias de *Trichophyton rubrum*, imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia (40X) **(a)**. Neutrófilos sin estímulo (C-). **(b)** Neutrófilos estimulados con PMA (C+). **(c)** Neutrófilos estimulados con conidias completas de *Trichophyton rubrum*.

Experimento # 2

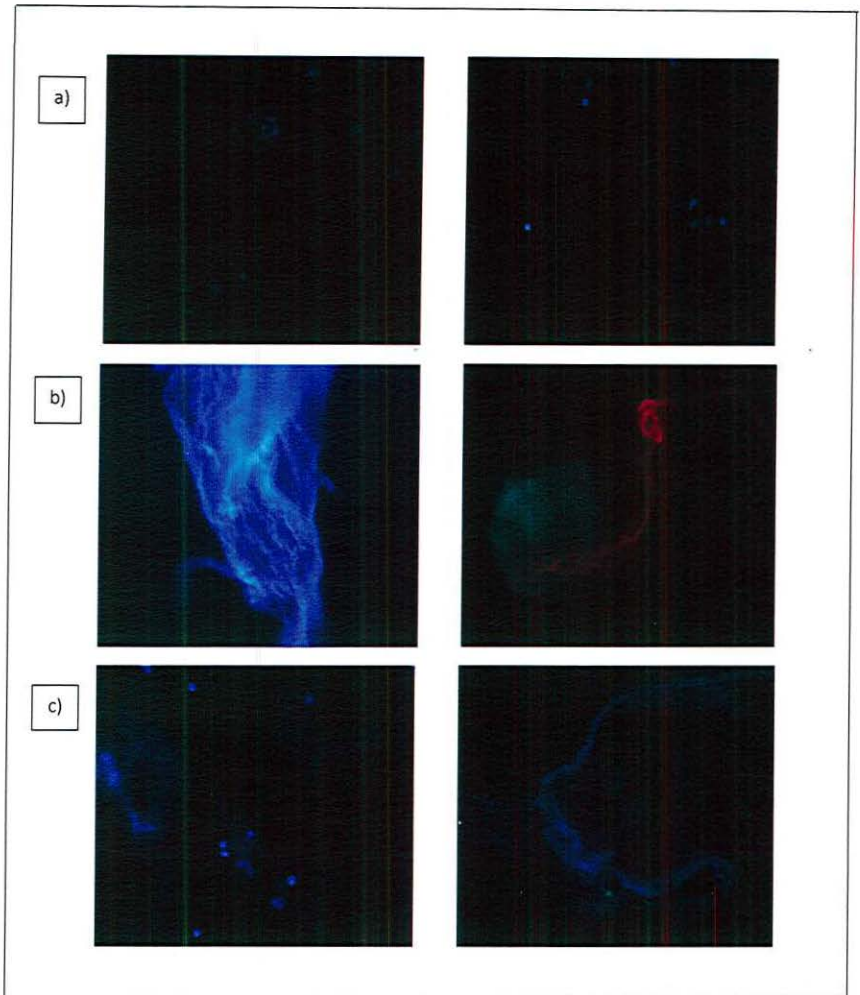


Fig. 19.- Inducción *in vitro* de NET con conidias de *Trichophyton rubrum*, imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia (40X) **(a).** Neutrófilos sin estímulo (C-). **(b)** Neutrófilos estimulados con PMA (C+). **(c)** Neutrófilos estimulados con conidias completas de *Trichophyton rubrum*.

Experimento # 3

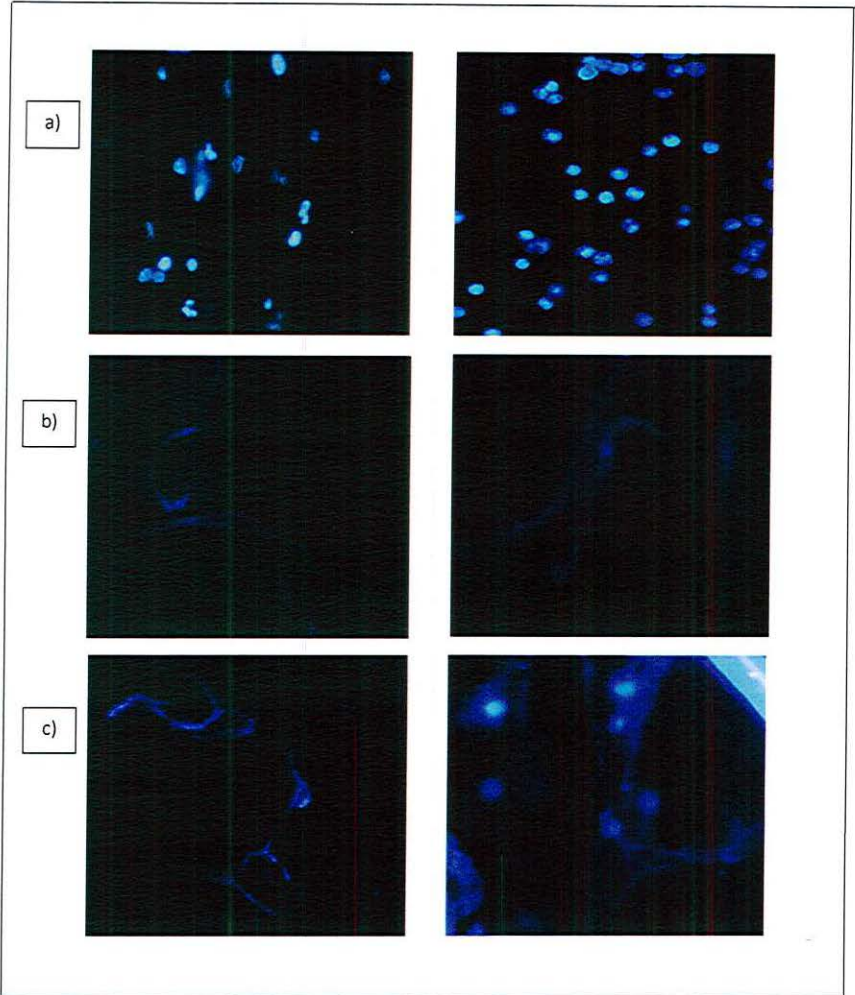


Fig. 20.- Inducción *in vitro* de NET con conidias de *Trichophyton rubrum*, imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia (40X) (a). Neutrófilos sin estímulo (C-). (b) Neutrófilos estimulados con PMA (C+). (c) Neutrófilos estimulados con conidias completas de *Trichophyton rubrum*.

Experimento # 4

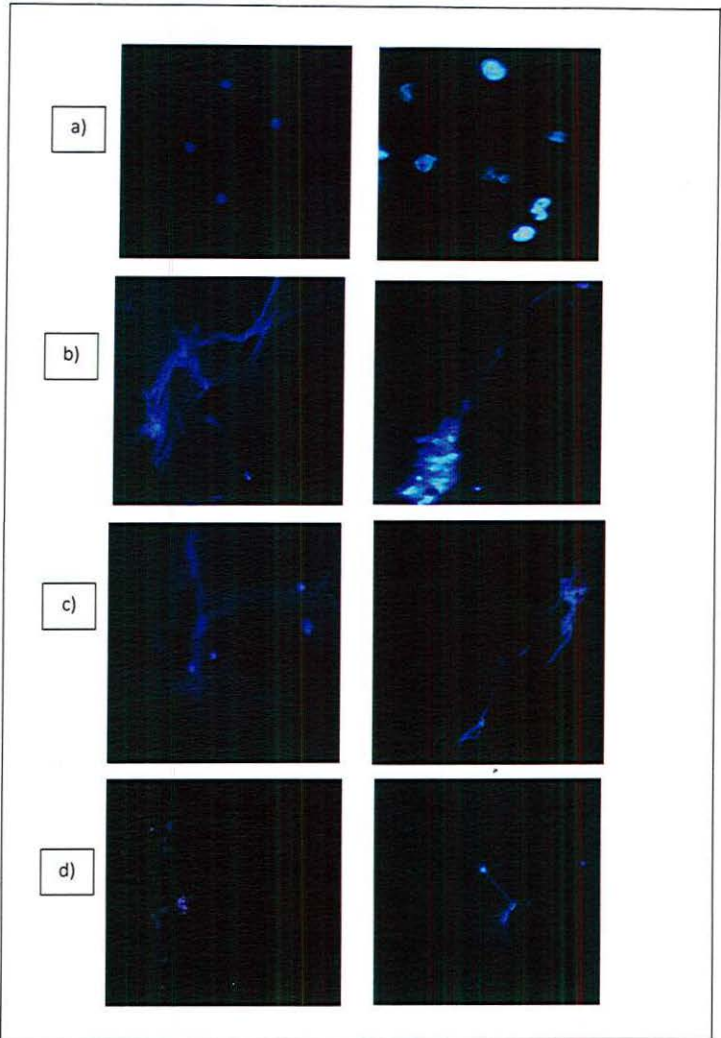


Fig. 21.- Inducción *in vitro* de NET con extracto sonicado de conidias de *T. rubrum*: imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia (40X). (a). Neutrófilos sin estímulo (C-). (b). Neutrófilos estimulados con PMA (C+). (c). Neutrófilos estimulados con conidias completas de *Trichophyton rubrum*. (d). Neutrófilos estimulados con extracto sonicado de conidias.

Experimento # 5

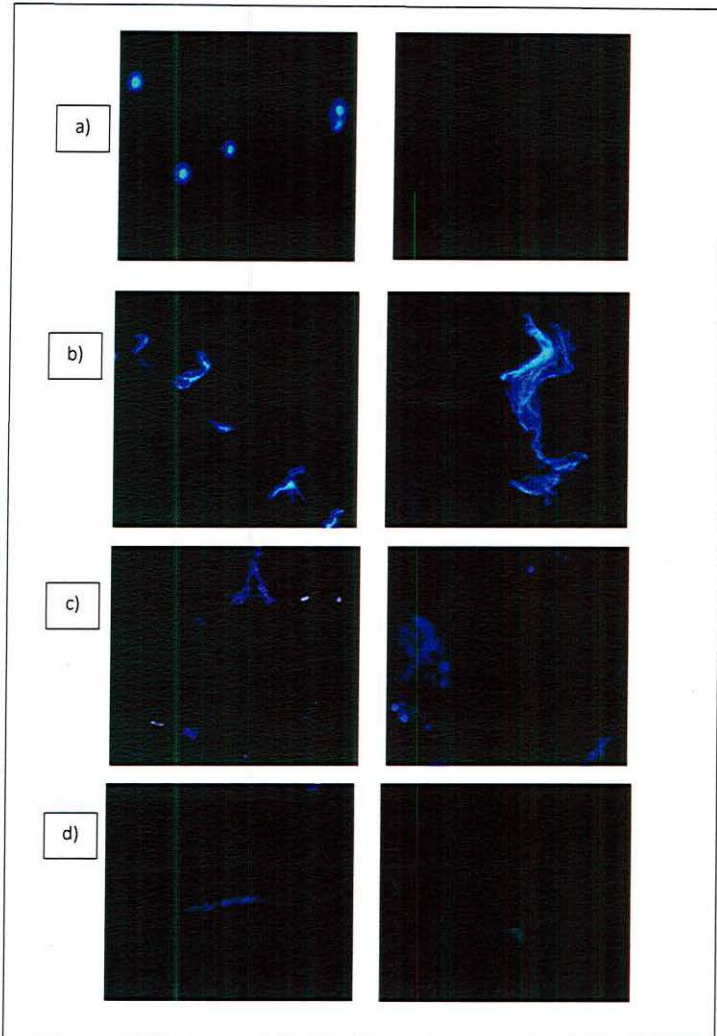


Fig. 22.- Inducción *in vitro* de NET con extracto sonicado de conidias de *T. rubrum*: imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia (40X). **(a).** Neutrófilos sin estímulo (C-) . **(b).** Neutrófilos estimulados con PMA (C+). **(c).** Neutrófilos estimulados con conidias completas de *Trichophyton rubrum*. **(d).** Neutrófilos estimulados con extracto sonicado de conidias.

Experimento # 6

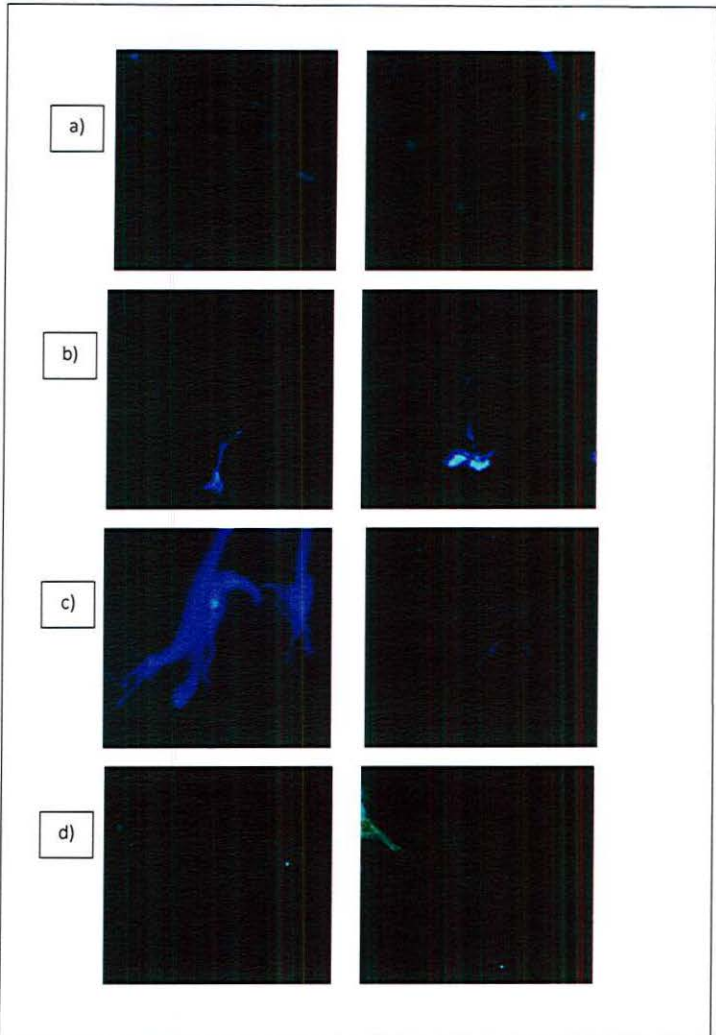


Fig. 23.- Inducción *in vitro* de NET con extracto sonicado de conidias de *T. rubrum*: imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia (40X). **(a).** Neutrófilos sin estímulo (C-). **(b).** Neutrófilos estimulados con PMA (C+). **(c).** Neutrófilos estimulados con conidias completas de *Trichophyton rubrum*. **(d).** Neutrófilos estimulados con extracto sonicado de conidias.

10.- DISCUSIÓN

La naturaleza del DNA como polinucleótido que dentro de su estructura contiene desoxirribosa y bases nitrogenadas complementarias unidas por enlaces fosfodiéster y puentes de hidrógeno (Blanco, 1994), la ubican como una molécula jerárquica, que contiene la información genética de todos los organismos biológicos. En este trabajo se demostró que no solo es una molécula que almacena y protege información, sino que también es una molécula utilitaria ya que participa en la protección del organismo contra agentes infecciosos, y puede liberarse al espacio extracelular en forma de red en conjunto con moléculas accesorias antimicrobianas (Brinckman, 2004). Ampliando así el conocimiento de su función, se ha demostrado este novedoso papel que desempeña el DNA en los granulocitos, abriendo la posibilidad de nuevas hipótesis para la realización de investigaciones sobre este mecanismo diferente a la apoptosis, llamado "netosis", desarrollado evolutivamente como protección contra la infección, extendible a distintos modelos biológicos de invertebrados y vertebrados para poder demostrar la filogenia de este mecanismo de adaptación.

Resultados previos de nuestro grupo de trabajo con conidias del hongo *T. rubrum* y su homogenado interactuando con queratinocitos *in vitro*, revelaron que los queratinocitos responden a un estímulo antigénico de las conidias y el homogenado, proliferando y diferenciándose en respuesta a un estímulo, además por medio de los receptores TLR-2, TLR-4 y TLR-6 inducen la producción de péptidos antimicrobianos como la beta-defensina 2 y las interleucinas 1 beta y ocho (García y col. 2010). En continuación con ese trabajo, aquí se muestra que los neutrófilos también responden al estímulo de las conidias completas de *T. rubrum*, formando las redes de DNA e interactuando con las conidias del microorganismo, pero en el caso del sonicado-homogenado se inducen también a las NET.

Otros trabajos reportan que las NET atrapan y eliminan bacterias. Utilizando *Staphylococcus aureus*, se reporta que ésta, reacciona con los neutrófilos y estos sufren netosis, liberando posteriormente las NET (Fuchs, 2007). También se

demonstró que el DNA es el principal componente de las NET ya que en un experimento con *Streptococcus pyogenes* y tratamientos con DNAsas no se logra atrapar a las bacterias, y por lo tanto eliminarlas, debido a que las redes son desintegradas por la DNAsa (Buchanan, 2006).

En otro experimento con *Streptococcus pneumoniae* los resultados demostraron que los neumococos son atrapados, pero, a diferencia de otros patógenos, no mueren por las NET, debido a que los neumococos producen DNAsas como mecanismo de evasión. Además, se demuestra que escapar de las NET promueve la difusión de los neumococos de las vías respiratorias superiores de los pulmones y de los pulmones al torrente sanguíneo durante la neumonía (Beiter, 2006). En un estudio similar se experimentó con *Mycobacterium tuberculosis*, y el resultado demostró que las micobacterias estimulan a los neutrófilos que liberan a las NET pero las redes no logran destruir a las bacterias con sus moléculas accesorias (Ramos, 2008).

Se han realizado varios experimentos para inducir de manera directa o indirecta a las NET con distintos microorganismos, pero nunca se había realizado con las conidias ni con ninguna estructura de *T. rubrum*, e inclusive tampoco con el extracto sonicado de conidias. Quizá en el sonicado acuoso solo quedan los patrones moleculares del hongo, al ser destrozadas las conidias por sonicación, puede que se pierda la energía para poder parasitar, ya que se necesita la conidia completa entre otras condiciones para poder perpetuar su especie.

Lo anterior, en conjunto, nos permite hipotetizar que el sonicado-homogenado de conidias puede tener un efecto similar a una vacuna, ya que al homogenizar por sonicación, la conidia se rompe y no tiene el peligro de parasitar, pero sí, la ventaja de iniciar una respuesta inmune, lo cual se puede aplicar al caso de infecciones en la piel y en otros sitios o en enfermedades infecciosas que involucren a los neutrófilos.

11.- CONCLUSIONES

- 1) Se aisló el microorganismo patógeno *Trichophyton rubrum*. Se mantuvo la cepa cultivada de *Trichophyton rubrum*. Se obtuvo el extracto de conidias de *Trichophyton rubrum*.
- 2) Se aislaron y cultivaron neutrófilos de sangre periférica humana.
- 3) Se logró Inducir *in vitro* a los neutrófilos de sangre periférica humana la producción de NET con la estimulación de conidias y especialmente con el homogenado de conidias de *T. rubrum*.

12.-REFERENCIAS

- Aga, E., Katschinski, D. M., van Zandbergen, G., Laufs, H., Hansen, B., Muller, K. (2002). Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol*: 169: 898–905.
- Agrawal, A., Eastman, Q. M., Schatz, D. G. (1998). Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature*: 394: 744-751.
- Almeida, S. R. (2008). Immunology of Dermatophytoses. *Mycopathologia*: 166: 277-283.
- Anderson, K. V., Jurgens, G., Nusslein, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell*: 42:791-798.
- Appelberg, R. (2006) Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol*: 15: 87–92.
- Arenas, R. (2002). Dermatofitosis en México. *Rev Iberoam Micol*: 19: 63-67.
- Bainton, M. D., Ulliyod, J., Farquhar, G. (1971). The development of neutrophilic polymorphonuclear leucocytes in human bone marrow. *The journal of experimental medicine*: 134. 907-934.
- Baker, V. S., Imade, G. E., Molta, N. B., Tawde, P., Pam, S. D., Obadofin, M. O. (2008). Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. *Malar J*: 7: 41.
- Beck, G., Cooper, E. L., Habicht, G. S., Marchalonis, J. J. (1994). Primordial Immunity, foundations for the Vertebrate Immune System. New York: New York. Academy of Sciences. 712: 726.
- Beck, G., Habicht, G. (1996). Immunity and the invertebrates. *Scientific American*: 60-66.
- Beutler, B., Poltorak, A. (2000). Sepsis and evolution of the innate immune response. *Crit Care Med*: 29: S2-S7.

- Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R. A., Zychlinsky, A. (2009). Restoration of NETs formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*: 114: 2619–2622.
- Binet F., Chiasson, S., Girard D. (2009). Interaction between arsenic trioxide (ATO) and human neutrophils. *Immunol Res*: 4: 25-61.
- Bodaño, A., González, A., Ferreiros, I., Balada E., Ordi, J., Carreira, P. (2006). Association of a non-synonymous single-nucleotide polymorphism of DNASE1 with SLE susceptibility. *Rheumatology*: 45: 819–23.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M., Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol*: 12: 64-76.
- Boman, H. G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol*: 3: 61-92.
- Bonifaz, A. (2000). Dermatofitosis. *Micología Médica Básica*. México: Méndez editores: 35-95.
- Bosch, X. (2011). Systemic lupus erythematosus and the neutrophil. *N Engl J Med*: 365: 758–60.
- Bottaro, A., Inlay, M., Matzke, M. J. (2006). Immunology in the spotlight at the dover intelligent design trial. *Nat Rev Immunol*: 7: 433-435.
- Bowdish, D. M. E., Davidson, D. J., Hancock, R. E. W. (2005). A reevaluation of the role of host defense peptides in mammalian immunity. *Curr Protein Pept Sci*: 6:35-51.
- Bowdish, D. M., Davidson, D. J., Lau, Y. E., Scott, M. G., Hancock, R. E. W. (2005). Impact of LL-37 on antiinfective immunity. *Journal of Leukocyte Biology*: 77: 451-9.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*: 303: 1532–1535.
- Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2007). Beneficial suicide: Why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*: 5: 577–582.

- Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*: 3: 238-250.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nat Rev Microbiol*: 3: 238-50.
- Brown, K., Hancock R. E. (2006). Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology*: 18: 24–30.
- Buchanan, J. T., Simpson, A. J., Aziz, R. K., Liu, G. Y., Kristian, S. A., Kotb, M. (2006). DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol*: 16: 396–4.
- Bulet, P., Stöcklin, R., Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev*: 198: 169-84.
- Cabral, A. R., Alarcón, D. (1998). Autoantibodies in systemic lupus erythematosus.
- Calderón, R. A., Hay, R. J. (1987). Fungicidal activity of human neutrophils and monocytes on dermatophyte fungi *Trichophyton quinckeanu* and *Trichophyton rubrum*. *Immunology*: 61: 289-295.
- Camicia, G., de Larrañaga, G. Trampas extracelulares de neutrófilos: un mecanismo de defensa con 2 caras. *Med Clin (Barc)*. 2012.
- Campos, M. R. M., Russo, M., Almeida S. R. (2006). Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. *Microbes infect*: 8: 372-379.
- Carrol, M. (2004). The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Pub*: 5: 10: 981-986.
- Clark, F. A., Klebanoff, S. J. (1978). Chronic granulomatous disease: studies of a family with impaired neutrophil chemotactic, metabolic and bactericidal function. *Am J Med*: 65: 941–948.

- Clark, S. R., Ma, A. C., Tavener, S. A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M. M. (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*: 13: 463–469.
- Corbin, B. D., Seeley, E. H., Raab, A., Feldmann, J., Miller, M. R., Torres, V. J. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science*: 319: 962–965. *Curr Opin Rheumatol*: 10: 409–16.
- Dale, D. C., Boxer, L., Liles, W. C. (2008). The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*: 112: 935–45.
- Desloges, N., Schubert, C., Wolff, M. H., Rahaus, M. (2008). Varicella-zoster virus infection induces the secretion of interleukin-8. *Med Microbiol Immunol*: 197: 277–84.
- Doan, T., Harvey, R., Celada, A. (2008). *Immunobiologia*. Williams & Wilkins Editions. Barcelona: 336p.
- Du Pasquier, L. (2000). The phylogenetic origin of antigen-specific receptors. origin and evolution of the vertebrate immune system. Berlin, Springer. 248: 159-185.
- Fang, F. C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiology*: 2: 820-832.
- Flajnik, M. F., Du Pasquier, L. (2004). Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends in Immunology*: 25: 640-644
- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*: 176: 231–241.
- Fuchs, T. A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, Jr. D. D. (2010). Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci*: 107: 15880–5.
- Gallo, R. L., Ono, M., Povsic, T., Page, C., Eriksson, E., Klagsbrun, M. (1994). Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc Natl Acad Sci USA*: 91: 11035-9.

- García, L., Islas, A., Huizar, M., Flores, L. (2011). *Trichophyton rubrum* manipulates the Innate Immune functions of human keratinocytes. *Cent Eur J Biol*: DOI: 10.2478/s11535-011-0060-6.
- Grône A. (2002). Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopath*: 88: 1-12.
- Guimarães, A. B., Nascimento, M. T., Froment, G. S., Soares, R. P., Morgado, F. N., Conceicao, F. (2009). *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci*: 106: 6748–53.
- Hakim, A., Furnrohr, B. G., Amann, K., Laube, B., Abed, U. A., Brinkmann, V. (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci*: 107: 9813–8.
- Hale, J. D. F., Hancock, R. E. W. (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Rev Anti Infect*: 5: 951-959.
- Hancock, R. E., Diamond, G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol*: 8: 402-10.
- Hawksworth, D. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol.Res*: 105: 1422–1432.
- Hoffbrand, A. V., Pettit, J. E., Moss, P. A. (2006). *Essential Haematology 5th Ed.* Massachusetts U. S. A. Blackwell Publishing: 388 p.
- Hoffman, J. A., Kafatos, F.C., Janeway, C. A., Ezekowitz, R. R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*: 284: 1313-1318.
- Hohl, T. M., Rivera, A., Pamer, E. G. (2006). Immunity to fungi. *Curr Op Immunol*: 18: 1-8.
- Hong, W., Juneau, R. A., Pang, B., Swords, W. E. (2009). Survival of bacterial biofilms within neutrophil extracellular traps promotes non typeable *Haemophilus influenzae* persistence in the chinchilla model for otitis media. *J Innate Immun*: 1: 215–24.

- Islas, A., Garcia, L. (2007). Keratinocytes from human skin respond as typical immune cells after stimulation with *Trichophyton rubrum*. *Nat Prec*: 930.1.
- Janeway, C. A., Medzhitov, R. (1998). Introduction: the role of innate immunity in the adaptive innate response. *Semin Immunol*: 10: 349-350.
- Janeway, C. A., Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*: 20: 197–216.
- Janeway, C. A., Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*: 20: 197–216.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, J. M. (2001). Evolution of the immune system: Past, present and future. *Immunobiology*. New York. Garland publishing: 302-312.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, J. M. (2001). *Immunobiology*. New York. Garland publishing: 16-45.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2005). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland Science: 341p.
- Klebanoff, S. J. (1999). Myeloperoxidase. *Proc. Assoc. Am. Physicians*: 111: 383–389.
- Köllisch G., Kalali B. N., Voelcker V., Wallich R., Behrendi H., Ring J. (2005). Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immunity response of human epidermal keratinocytes. *Immunology*: 114: 531-541.
- Kopp, E. B., Medzhitov, R. (1999). The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol*: 11: 13-18.
- Kupper T. S., Fuhlbrigge R. C. (2004). Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol*: 4: 211-221.
- Langman, R. E. (1989). Evolutionary origins of the immune system. *The immune system*. San Diego. Academic Press. 209 p.

- Lee, P. H., Rudisill, J. A., Lin, K. H., Zhang, L., Harris, S. M., Falla, T. J. (2004). HB-107, a nonbacteriostatic fragment of the antimicrobial peptide cecropin B, accelerates murine wound repair. *Wound Repair Regen*: 12: 351-8.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*: 86:973-983.
- Li, M. O., Sarkisian, M. R., Mehal, W.Z., Rakic, P., Flavell, R. A. (2003). Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science*:302: 1560–63.
- Linehan, S. A., Martinez, L., Gordon, S. (2000). Macrophage lectins in host defence. *Microbes Infect*: 2: 279-88.
- Manzenreiter, R., Kienberger, F., Marcos, V., Schilcher, K., Krautgartner, W. D., Obermayer, A. (2012). Ultrastructural characterization of cystic fibrosis sputum using atomic force and scanning electron microscopy. *J Cyst Fibros*: 11: 84–92.
- Marcos, V., Zhou, Z., Yildirim, A. O., Bohla, A., Hector, A., Vitkov, L. (2010). CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nat Med*: 16: 1018–1023.
- Margulis, L., Sagan, D. (2002). *Acquiring genomes a theory of the origins of species*. Basics Books. New York: 240p.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: A renewed sense of self. *Science*: 206: 301-305.
- Mayorga, J., Muñoz, F., Barba, J., Hurtado, N. A. (1995). Dermatofitosis: Estudio epidemiológico en el Instituto Dermatológico de Jalisco (1984-1992). *Dermatología Rev Mex*: 39: 18-21.
- Medzhitov, R. (2010). Inflammation: new adventures of an old flame. *Cell*: 140: 771–776.
- Medzhitov, R., Janeway, C. A. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*: 9:4-9.

- Medzhitov, R., Janeway, C. A. (2000). Advances in Immunology: Innate Immunity. *J Med*: 343: 338-344.
- Medzhitov, R., Janeway, C. A. (2000). Advances in Immunology: Innate Immunity. *J Med*: 343: 338-344.
- Medzhitov, R., Janeway, C. A. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*: 173: 89-97.
- Méndez, L. J., López, R., Hernández, F. (2004). Micosis superficiales: Dermatofitos. Actualidades en Micología Médica (2ª ed.). México, Facultad de Medicina UNAM: 109-142.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*: 6: 173–182.
- Nauseef, W. M. (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev*: 219: 88–102.
- Nestle, F. O., Di Meglio, P., Quin, J., Nickoloff, B. (2009). Skin immune sentinels in health and diseases. *Nat Rev Immunol*: 9: 679-691.
- Oppenheim, J. J., Yang, D. (2005). Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol*: 17: 359-65.
- Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *Cell*: 191:677–691.
- Papayannopoulos, V., Zychlinsky, A. (2009). NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol*: 30: 513–21.
- Pigliucci, M. (2007). Do we need an extended evolutionary Synthesis? *Evolution journal*: 61-12: 2743–2749.

- Ramos, V., Mondragón, R., Mondragón, M., González, S., Muñoz, S., Rojas, O. (2009). Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. Edinb: 89: 29–37.
- Roeder, A. (2004). Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol*: 42: 485–498.
- Rollinghoff, M. (1997). Immunity, components of the immune system and immune response. *Biologicals*: 25: 165-168.
- Romani, L. (2004). Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*: 43: 1-13.
- Rugeles, M. J. (2001). Etiología y características clínicas de la onicomicosis en un grupo de pacientes inmunosuprimidos. *Infectio*: 5: 7-13.
- Scott, M. G., Hancock, R. E. W. (2000). Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev Immunol*: 20: 407-31.
- Segal, A. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol*: 23: 197–223.
- Shatwell, K. P., Segal, A. W. (1996). NADPH oxidase. *The international journal of biochemistry and cell biology*: 28: 1191–1195.
- Shi, J., Ross, C. R., Leto, T. L., Blecha, F. (1996). PR-39 a proline-rich antibacterial peptide that inhibits phagocyte NADPH oxidase activity by binding to Src homology 3 domains of p47 phox. *Proc Natl Acad Sci USA*: 93: 6014-8.
- Stein, J., Sonoda, K. H., Faunce, D., Zhang, J. (2000). Regulation of adaptive immune responses by innate cells expressing NK markers and antigen transporting macrophages. *J Leukoc Biol*: 67: 488-94.
- Steintaesser, L., Koehler, T., Jacobsen, F., Daigeler, A., Ole, G., Langer, S. (2008). Host defense peptides in wound healing. *Mol Med*: 14: 528-37.

- Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. (2003). Toll like receptor. *Annu Rev Immunol*: 21:335–76.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature*: 302: 575-581.
- Travis, J. (2009). On the origin of the immune system. *Science*: 324: 580-582.
- Trinchieri, G. (1997). Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ). *Curr Opin Immunol*: 9:17-23.
- Uitto, J., Richard, G., McGrath, J. D. (2007). Disease of epidermal keratins and their linker proteins. *Cell*: 312:
- Ulevitch, R. J., Tobias, P. S. (1995). Receptor dependent mechanism of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol*: 13: 437-457.
- Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol*: 8: 668–676.
- Von Kockritz, M., Goldmann, O., Thulin, P., Heinemann K., Norrby, A., Rohde, M. (2008). Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*: 111: 3070–80.
- Wartha, F., Beiter, K., Albiger, B., Fernebro, J., Zychlinsky, A., Normark, S. (2007). Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell Microbiol*: 9: 1162–1171.
- Willment, J. A., Brown, G. D. (2008). C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Cell*: 16: 27-32.
- Woolhouse, M. E., Haydon, T., Antia, R. (2005). Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trends in Ecology and evolution*: 20: 5: 238-244.
- Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C. T., Semeraro, F. (2009). Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med*: 15: 1318–21.

- Yang, D., Biragyn, A., Hoover, D. M., Lubkowski, J., Oppenheim, J. J. (2004). Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol*: 22: 181-215.
- Yasutomo, K., Horiuchi, T., Kagami, S., Tsukamoto, H., Hashimura, C., Urushihara, M. (2001). Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*: 28: 313-4.
- Yousefi, S., Gold, J. A., Andina, N., Lee, J. J., Kelly, A. M., Kozlowski, E. (2008). Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med*: 14: 949-953.
- Zhang, Q., Itagaki, K., Hauser, C. J. (2010). Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase. *Shock*: 34: 55-59.
- Zhou, J., Yang, X. Q., Fu, Z., Zhao, X. D., Jiang, L. P., Wang, L. J.(2008). Increased pathogenesis and inflammation of airways from respiratory syncytial virus infection in T cell deficient nude mice. *Med Microbiol Immunol*: 197: 345-51.

TESIS/CUCBA