

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.**

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN.  
PROGRAMA DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA  
MOLECULAR.**

**Coccidioidomycosis sistémica:  
Desarrollo de un modelo murino con  
*Coccidioides posadasii*.**



**T E S I S  
QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN  
BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA  
M O L E C U L A R,  
P R E S E N T A :  
ADRIANA LETECHIPÍA SALCEDO.**

**MÉXICO**

**D.F.**

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neuropatología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” y en el Laboratorio de Bacteriología Médica de La Escuela Nacional de Ciencias Biológicas de El Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de:

El Dr. Citlaltepelt Salinas Lara.

y

La Dra. Graciela Castro Escarpulli.

Así mismo, formó parte del programa:

Diagnóstico convencional y molecular de bacterias de interés médico, clave SIP 948, SIP 1079.

## **Agradecimientos.**

**Por la colaboración en el desarrollo de este trabajo al:**

**Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”,  
por el uso de instalaciones y la donación de los animales de experimentación.**

Colaborador: Dr. Rogelio Hernández Pando.

Colaborador: Biólogo Juan Carlos León Contreras.

**Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”,  
por el uso de instalaciones y la consultoría sobre el manejo de cepas de *Coccidioides* sp.**

Colaborador: Q.B.P. Bertha Muñoz Hernández.

Colaborador: Biólogo Gabriel Palma Cortés.

**Departamento de Microbiología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad  
Autónoma de Nuevo León,  
por la donación de la cepa de *C. posadasii* empleada en este trabajo y la consultoría en el  
manejo de esta.**

Colaborador: Dra. Gloria González González.

**Instituto Nacional de Pediatría,  
por el uso de instalaciones y la consultoría en técnicas histológicas.**

Colaborador: Histotecnólogo Eduardo Farfán Morales.

Colaborador: M. en C. Francisco García Vázquez.

## **Agradecimientos.**

Al Programa de Posgrado en Biomedicina y Biotecnología Molecular de La Escuela Nacional de Ciencias Biológicas de El Instituto Politécnico Nacional y Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo.

Becaria No. 216245.

“He comenzado con la persona en el espejo,  
le he preguntado sobre como cambiar su camino.

Ningún mensaje pudo ser más claro,  
si tu quieres hacer de el mundo un lugar mejor,  
mírate a ti mismo y has el cambio”

**M. J.**

## **BREVE HISTORIA.**

Recuerdo con alegría cuando íbamos a casa de los vecinos y los amigos de Papá. Mamá me repetía una y otra vez que no hiciera travesuras. Lo que verdaderamente hacía, y que solamente conocía mi hermana, es que practicaba mis primeros experimentos.

Después de saludar a los anfitriones, Mariana y yo nos encerrábamos en el baño. Mariana revisaba que nadie nos interrumpiera (o nos descubriera), mientras yo tomaba prestados el perfume, las cremas, los limpiadores, el shampoo, el jabón y la pasta de dientes y me dedicaba a revolver metódicamente los productos, con la finalidad de observar algún fenómeno que expeliera humo o cambiara de color, nada de eso ocurrió; sin embargo, la mezcla que más me llamaba la atención era la que resultaba de juntar una parte de perfume por cada tres de agua. Esta última producía un coloide blanco lechoso. ¿Por qué razón pasaba esto? La verdad es que no tenía ni idea, apenas tenía 5 años de edad y la teoría de las ciencias estaba a unos años de distancia, pero como buena científica innata repetía el experimento tres, cuatro y hasta diez veces para demostrar su reproducibilidad. Por supuesto que en el intento, me terminaba la botellita de Channel No. 5.

Horas más tarde, una vez que los amigos de Papá se daban cuenta del olor a pasta de dientes en el jabón líquido o a perfume en el inodoro, Mamá, con una risa tímida, pedía disculpas a mi nombre.

En casa, Mamá me llamaba la atención y me hacía prometer que no repetiría nada de aquello. ¡Pobre de mi Madre!, ¿Quién diría que seguiría haciéndolo por algunos años más? Desde luego los experimentos fueron subiendo de nivel, inclusive las lagartijas del patio de mi tía me temían y con razón, pues la última murió ahogada y donó su cuerpo a la ciencia. Le practiqué la autopsia mientras Mariana veía con un dejo de horror y fascinación.

Mamá decidió convertirse en mi segunda colaboradora (Mariana fue la primera), me alentó a ver programas científicos y culturales por televisión en el Canal Once. “A la Cachi Cachi Porra” y “El mundo de BeakMan” eran mis favoritos. A la edad de 10 años recibiría como regalo un Juego de Química y un Microscopio “Mi Alegría”, que sin duda influenciaron en la elección de mi carrera y ahora en lo que me he de dedicar de por vida.

## **DEDICATORIA.**

A mi madre, Estela, por permitirme realizar mis primeros experimentos, por soltar mi mano para dar mis primeros pasos en la vida que me entregó y por cada sonrisa, cada lágrima y cada palabra que me ha dedicado. Mamá, te amo.

A mi padre, Pedro, por ser mi gran amigo y confidente, porque gracias a él he hecho de la música de “The Rolling Stones” el sound track de mi vida.

¿A caso no es bueno estar vivos?

A Mariana, mi mejor amiga, confidente y definitivamente el mejor regalo que me han dado mis padres. Hermana, gracias por acompañarme, por ser colega y por fungir como alumna de servicio social, eres la mejor. Estas a punto de dar un gran paso en tu vida, se que serás una madre maravillosa, dale lo más importante de este universo, amor.

A Luz y Laura por permitirme entrar en sus vidas y por llegar a la mía, por las palabras de aliento y el apoyo, por la alegría, el Sheridan’s, las cenas y sobre todo, gracias por cuidar de Papá, Pasha, Smuta y Luna. Las quiero.

“Talita cumi eim sof”.

A Yuya, por acompañarme y darme amor, por seguir a nuestro lado después de todo lo que hemos vivido, por regañarme en cada desvelada, comida y juego, por esos ojos felinos.

A mi Pasha que recargó su cabeza en mi regazo como despedida. Patitas, gracias por haberme elegido, como dice Papá, nos vemos en el río.

A la Doctora Chela, por sus consejos, palabras y por haber confiado en mí a pesar de saber que soy de otra galaxia. Gracias por la atención, el apoyo, la confianza, son cosas invaluable y que aprecio mucho en usted. Gracias por haber guardado aquel trabajo de fitopatología, significa mucho y me alienta a seguir siendo yo misma.

Al Doc Citlal, por ser mi tutor, mentor y amigo, por la libertad e imponerme retos, por escucharme cada vez que lo necesito y por ser un humano con escala de grises. Doc, ¡me invita a la siguiente expedición! realmente ha sido toda una experiencia su método de formación.

A mis amigas: Claudia, Ruby, Esmeralda y Diana, por aquellos momentos en Tepic. Gracias por aceptarme, disfruté mucho su compañía y me volvieron fiel amante de Nayarit.

A Cecy, Erika, Cinthia, Dany Gorras, Memo y Fredy del laboratorio de “Bacter Médica” por su amistad y el apoyo moral y emocional de cada día. Comprobé que las buenas relaciones sociales influyen en el desempeño de cada uno.

A Benji, Vicky y July por su atención y enseñanzas y el valor de repetir el verano. Gracias por su amistad que siguen cultivando.

A los 7 de la suerte: Omar, Amir, Ivonne, Dalí, Lili, Enrique y Gustavo, por tomar el servicio social y ayudar a mi formación.

A mi clan: Masta Viasho, Lalo y Chuchin, por los viernes de Halo y las hamburguesas matutinas. Primo, gracias por ofrecerme un espacio para crecer, te considero un hermano y te expreso mi cariño incondicional.

Y por último y no por eso menos importante, a Carlos Sánchez Garibay, por reconocer a Mokona aquel día 12 de Agosto, por no agotar sus sentimientos, por los buenos y malos momentos, por preocuparse más que el autor de esta tesis, por quedarse con el Sol y darme la Luna, por la torre oscura, los ambigramas, las batallas, el omelett, por el pasado y el futuro y sobre todo por permanecer a mi lado hoy. Carlo, eres mi mejor amigo, mi ideología no me permite creer en el destino, sin embargo, tu eres el único que me hace dudar hasta en mis momentos más certeros, quizá sea el amor o quizá hayas roto una muralla en mi vida. En tus propias palabras, gracias por iniciar este viaje, hacerlo conmigo y esperar a que nunca acabe.

Te amo.

“Gracias a la vida, que me ha dado tanto”.



## ÍNDICE.

INDICE DE FIGURAS.	i
RESUMEN.	ii
ABSTRACT.	iii
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Coccidioidomicosis.	1
1.1.1 Clasificación taxonómica del género <i>Coccidioides</i> .	1
1.1.2 Biología del género <i>Coccidioides</i> .	1
1.1.3 Ciclo de vida del género <i>Coccidioides</i> .	2
1.1.4 Características clínicas.	3
1.1.5 Epidemiología.	4
1.1.6 Hábitat y distribución.	5
1.1.7 Patogenia.	6
1.1.8 Histopatología.	6
1.1.9 Diagnóstico.	7
1.1.10 Tratamiento.	8
1.2 Antecedentes del modelo experimental.	9
1.2.1 El modelo murino.	9
2. JUSTIFICACIÓN.	10
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	11
4. HIPÓTESIS.	11
5. OBJETIVO GENERAL.	12
5.1 Objetivos particulares.	12
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.	13
6.1 Material y métodos.	14
6.1.1. Inóculo.	14
6.1.1.1 Recuperación de la cepa.	14
6.1.1.2 Obtención del inóculo.	14

## CONTINUACIÓN DEL ÍNDICE.

6.1.1.3 Inoculación.	14
6.1.2 Sacrificio.	15
6.1.3 Cuenta de unidades formadoras de colonias en pulmón.	15
6.1.4. Histología.	15
6.1.4.1 Análisis histopatológico.	15
6.1.4.2 Morfometría de pulmón.	15
6.1.4.3 Microscopía electrónica.	16
7. RESULTADOS.	17
7.1 Modelo con inóculo de 120 artroconidios.	17
7.2 Modelo con inóculo de 60 artroconidios.	25
7.3 Modelo con inóculo de 30 artroconidios.	32
8. DISCUSIÓN.	41
9. CONCLUSIONES.	46
10. PERSPECTIVAS.	46
11. PRODUCTOS.	47
12. REFERENCIAS.	48

## INDICE DE FIGURAS.

Número de figura.	Página
1.- Ciclo de vida del género <i>Coccidioides</i> spp.	2
2.- Clasificación clínica de la coccidioidomicosis.	3
3.- Diagrama general de trabajo.	13
4.- Hallazgos histopatológicos en pulmón con el inóculo de 120 artroconidios.	18
5.- Morfometría de pulmón con el inóculo de 120 artroconidios	19
6.- Cuenta de unidades formadoras de colonias en pulmón con el inóculo de 120 artroconidios	20
7.- Hallazgos histopatológicos en hígado con el inóculo de 120 artroconidios.	21
8.- Hallazgos histopatológicos en bazo con el inóculo de 120 artroconidios.	22
9.- Hallazgos histopatológicos en corazón y riñón con el inóculo de 120 artroconidios.	23
10.- Hallazgos histopatológicos en cerebro con el inóculo de 120 artroconidios.	24
11.- Hallazgos histopatológicos en pulmón con el inóculo de 60 artroconidios.	26
12.- Morfometría de pulmón con el inóculo de 60 artroconidios	27
13.- Cuenta de unidades formadoras de colonias en pulmón con el inóculo de 60 artroconidios	28
14.- Hallazgos histopatológicos en hígado con el inóculo de 60 artroconidios.	29
15.- Hallazgos histopatológicos en bazo con el inóculo de 60 artroconidios.	30
16.- Hallazgos histopatológicos en cerebro con el inóculo de 60 artroconidios.	31
17.- Hallazgos histopatológicos en pulmón con el inóculo de 30 artroconidios.	33
18.- Morfometría de pulmón con el inóculo de 30 artroconidios.	34
19.- Cuenta de unidades formadoras de colonias en pulmón con el inóculo de 30 artroconidios.	35
20.- Micrografías de formas parasitarias de <i>C. posadasii</i> en pulmón.	36
21.- Hallazgos histopatológicos en hígado con el inóculo de 30 artroconidios.	37
22.- Hallazgos histopatológicos en bazo con el inóculo de 30 artroconidios.	38
23.- Hallazgos histopatológicos en cerebro con el inóculo de 30 artroconidios.	39
24.- Supervivencia de los animales de experimentación.	40

## RESUMEN.

La coccidioidomicosis es la micosis endémica respiratoria más frecuente y grave en humanos. Es ocasionada por los hongos dimórficos *Coccidioides immitis* y *C. posadasii*. Sus manifestaciones van desde la afección pulmonar hasta la diseminación sistémica. Esta última puede traer la muerte del individuo. En México, el hongo que afecta principalmente a la población es *C. posadasii*, pero debido a sus manifestaciones es comúnmente subdiagnosticado.

En la actualidad aun se desconocen muchos aspectos de la patogenia e histopatología de esta enfermedad. Para ello el modelo experimental representa una herramienta útil para la elucidación y comprensión de la patogénesis, resistencia del hospedero a la infección y a la búsqueda de terapias antifúngicas más eficaces; sin embargo no se cuenta con un modelo no invasivo que reproduzca la coccidioidomicosis sistémica por *C. posadasii*.

En el presente trabajo, se inocularon por vía intranasal tres grupos de ratones BALB/c con 30, 60 y 120 arthroconidios respectivamente de una cepa mexicana de referencia de *C. posadasii*. Se analizaron los cambios histopatológicos en pulmón, corazón, hígado, bazo, riñón, tubo digestivo y cerebro. Se realizó la morfometría y la cinética micológica a partir de pulmón, además de la microscopía electrónica de las fases parasitarias. La dosis de 120 arthroconidios mostró un patrón de enfermedad aguda, mientras que la dosis de 60 arthroconidios mostró un patrón de enfermedad más crónica. El número de muertes fue de 2 de 15 ratones inoculados (13.33%) tanto para la dosis de 60 como para la de 120 arthroconidios. La dosis de 30 arthroconidios mostró cambios histopatológicos heterogéneos, sin embargo, la dosis es suficiente para estimular al bazo en la producción de linfocitos B. A pesar de la dosis, la infección no llegó a cerebro durante el desarrollo del experimento (60 días). En todos casos la enfermedad parece autolimitarse y se muestra evidencia de que la enfermedad está en función de la dosis inoculada.

Se lograron reproducir los daños más comúnmente observados en humanos al igual que pericarditis e inflamación de pelvis renal, las cuales son poco comunes pero están reportadas en la literatura.

## **ABSTRACT.**

Coccidioidomycosis is the endemic respiratory mycosis more frequent and severe in humans. It is caused by dimorphic fungi *Coccidioides immitis* and *C. posadasii*. Its manifestations range from lung disease to systemic dissemination. The last one could bring the individual's death. In Mexico, the fungus that primarily affects the population is *C. posadasii*, but because of its manifestations is often underdiagnosed.

Today are still unknown many aspects of the pathogenesis and histopathology of this disease. The experimental model represents a useful tool for the elucidation and understanding of the pathogenesis and host resistance to infection, as well as to finding more effective antifungal therapies; however there is not a non-invasive model that reproduces coccidioidomycosis systemic by *C. posadasii*.

In this study, were inoculated intranasally three groups of BALB/c mice with 30, 60 and 120 arthroconidia respectively with a Mexican reference strain of *C. posadasii*. We analyzed the histopathological changes in lung, heart, liver, spleen, kidney, gastrointestinal tract and brain. Morphometry was performed and mycological kinetics from lung, in addition to electron microscopy parasitic forms. The dose of 120 arthroconidia showed a acute illness pattern, while the dose of 60 arthroconidia showed a chronic disease pattern. The number of deaths was 2 of 15 mice inoculated (13.33%) for both doses of 60 and for 120 arthroconidia. 30 arthroconidia dose showed a heterogeneous histopathological changes; however these dose is enough to stimulate the spleen to produce linfocites B. Despite the dose, the infection did not reach the brain during development of the experiment (60 days). In all cases the disease seems to limit themselves and showed evidence that the disease is dependent on the dose inoculated.

Managed to reproduce the damage was more commonly observed in humans as well as pericarditis and inflammation of renal pelvis, which are rare but are reported in the literature.

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1 Coccidioidomicosis.

La coccidioidomicosis, o fiebre del Valle de San Joaquín, es provocado por los hongos dimórficos *Coccidioides immitis* y *C. posadasii*. Es la micosis endémica de origen respiratorio más frecuente y grave.<sup>1</sup>

#### 1.1.1 Clasificación taxonómica del género *Coccidioides*.

Según Fisher (2002), la clasificación taxonómica de *Coccidioides* es la siguiente: pertenece al Reino: Eumycota; Phylum: Dikaryomycota; Sub-phylum: Ascomycota; Orden: Onygenales; Familia: Onygenaceae; Género: *Coccidioides*; Especies: *immitis* / *posadasii*. Esto indica que debe tener un teleomorfo correspondiente a un ascocarpo (estructura sexuada en forma de saco o canasta) que posee ascas (esporas sexuadas encerradas en el ascocarpo). Sin embargo, hasta la fecha no se han observado estas estructuras, por lo que se le considera un hongo mitospórico.<sup>2</sup> Estudios filogenéticos han permitido definir dos especies, *C. immitis* y *C. posadasii*.<sup>3</sup>

#### 1.1.2 Biología del género *Coccidioides*.

*Coccidioides* es un hongo dimórfico, que en el suelo y en cultivos bajo condiciones normales de laboratorio, se desarrolla con forma filamentosa (forma saprofita). La forma parasítica, que se da en los tejidos y bajo condiciones especiales de cultivo (medios líquidos a 40°C), es la esférula con endosporas.<sup>4</sup>

La forma filamentosa se desarrolla en un lapso de 3 a 15 días y produce colonias algodonosas, de blanco a gris claro, pulverulentas; mismas que desarrollan hifas septadas que limitan y dan lugar a estructuras cilíndricas pequeñas (2-4.5  $\mu\text{m}$ ) llamadas artroconidios. Estas partículas son altamente infecciosas. En los cultivos especiales a 40°C, el hongo empieza a desarrollar su ciclo parasitario, cuando los artroconidios comienzan a redondearse, aumentan de tamaño y la pared celular se hace más gruesa (esférulas); internamente, ocurre la división del núcleo y la segmentación del citoplasma (endosporas), con la producción de hasta 800 de ellas. La esférula termina por romperse, liberando su contenido. Al quedar libres, las endosporas conservan el potencial para convertirse en una nueva esférula.<sup>5, 6, 7</sup>

### 1.1.3 Ciclo de vida del género *Coccidioides*.

En el suelo el hongo se encuentra en forma filamentosa y los artroconidios son dispersados por el viento. Estos pueden ser inhalados por el ser humano. Se aloja en los pulmones y después de dos o tres días, cada artroconidio se transforma en esférulas con endosporas.<sup>4</sup> Las esférulas pueden ser expectoradas y arrojadas al suelo, donde regresarán a la forma saprofita. El ciclo se completa en pequeños roedores donde el hongo sigue una fase parecida a la del ser humano.<sup>8</sup>

Autores mexicanos (Muñoz *et al.* 2008) proponen que este ciclo de vida sea modificado pues han observado en pacientes con diabetes mellitus que presentan cavitación, y en pacientes con afección al sistema nervioso central, la coexistencia de formas parasíticas diferentes, por ejemplo: formas miceliales, esporas en diferentes estadios de filamentación, artroconidios en barril y artroconidios que generan esférulas y/o micelio (Figura 1).<sup>9</sup>

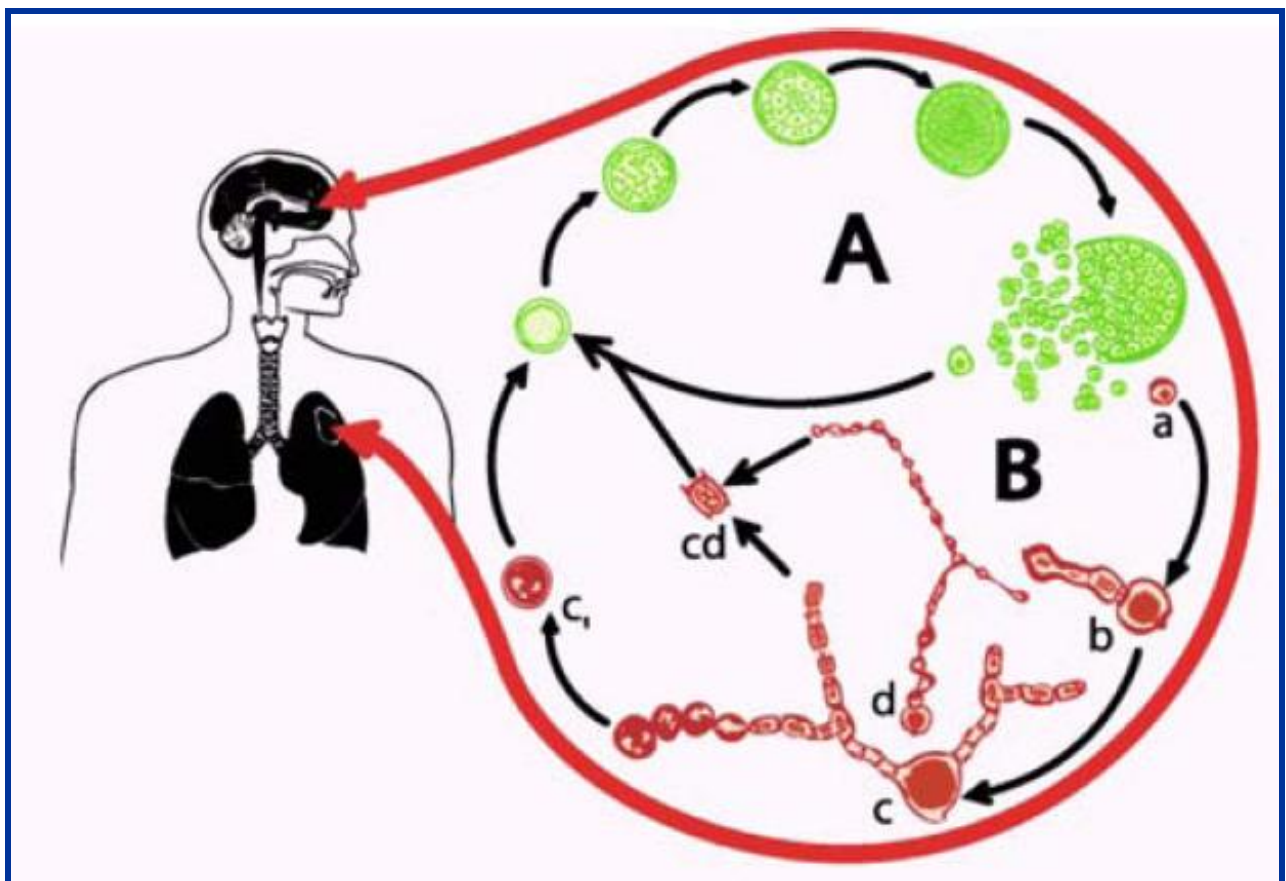


Figura 1.- Ciclo de vida de *Coccidioides* spp. A) Ciclo de vida típico (Esférula). B) Nuevas formas parasíticas; a) endospora, b) endospora en filamentación, c) esférula inmadura en filamentación, c<sub>1</sub>, cd y d esporas en diferentes estadios de filamentación (Muñoz y *et al.*, 2008).

### 1.1.4 Características clínicas.

Cerca del 60% de las infecciones no causan síntomas, el 40% restante representa a los pacientes sintomáticos cuyas manifestaciones son diversas, desde la afección pulmonar hasta la enfermedad pulmonar progresiva o diseminación extrapulmonar.<sup>10</sup> La mayoría de los pacientes con enfermedad primaria se recuperan espontáneamente, pero cuando el hongo se disemina, la infección adquiere una gravedad considerable, afectando la piel, los huesos, las articulaciones, las meninges y otros órganos; es en estos casos cuando la micosis puede adquirir un curso fatal.<sup>11-13</sup>

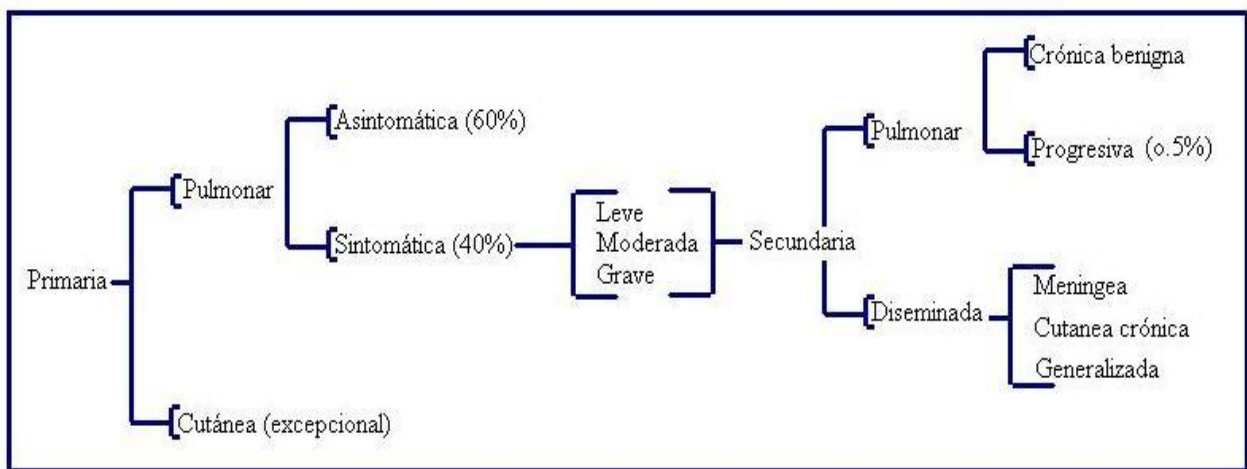


Figura 2.- Clasificación clínica de la coccidioidomicosis. (Modificado de Arenas, 2005).

La mayor parte de los pacientes con coccidioidomicosis, presentan alteraciones respiratorias que simulan una neumonía común o una tuberculosis.<sup>14, 15</sup>

En regiones donde la incidencia de tuberculosis es alta, pueden coexistir las dos enfermedades. La tuberculosis y la coccidioidomicosis comparten características epidemiológicas, clínicas, radiográficas e histopatológicas, lo que dificulta el diagnóstico correcto donde ambos padecimientos están presentes. Por tanto, en áreas donde ambas enfermedades son endémicas, es prudente realizar los estudios respectivos en cada paciente con características clínicas compatibles, pues el diagnóstico de una de ellas no excluye la presencia de la otra.<sup>14</sup>

En la coccidioidomicosis, los procesos de curso agudo con infiltrados pulmonares localizados, tienen síntomas y signos semejantes a los de una neumonía bacteriana con fiebre, tos, dolor torácico, expectoración purulenta o hemoptisis, disnea, síndrome de condensación pulmonar e



infiltrados lobulares homogéneos. A veces se presenta derrame pleural y adenomegalias en hilios pulmonares. Estos pacientes (15% de los casos) suelen responder bien a los antifúngicos y curan rápidamente. Las complicaciones fatales más comunes son el dolor en el pecho y choque séptico debido a la diseminación aguda de *Coccidioides* spp. Las localizaciones extrapulmonares más frecuentes son los ganglios linfáticos, los huesos, la piel, el hígado, el bazo y el sistema nervioso central (SNC). La afección al SNC se presenta en un 30 al 50% de los casos con enfermedad diseminada. La meningoencefalitis por *Coccidioides* spp, es semejante a la tuberculosa: evolución crónica, líquido cefalorraquídeo (LCR) con aspecto de agua de roca y baja concentración de glucosa, ataque a los núcleos basales y tendencia a producir bloqueos de la circulación del LCR con hidrocefalia, su pronóstico es grave.<sup>16, 17, 18</sup>

En México, la forma clínica más frecuentemente observada es la pulmonar y existe un escaso número de casos reportados con diseminación a la piel y los huesos; de las formas meníngeas, la gran mayoría de los registros proceden de pacientes pediátricos.<sup>18</sup> Además se han reportado dos casos de pericarditis por *Coccidioides* spp, en México, forma clínica muy poco común.<sup>19</sup>

### **1.1.5 Epidemiología.**

Desde 1941, se ha informado de brotes y epidemias de coccidioidomicosis, ligados a actividades humanas que producen aerosoles y a eventos naturales como tornados y terremotos. Ya que la infección depende de la exposición al hongo, es más frecuente en campesinos, soldados, arqueólogos y puede ser accidental en el laboratorio.<sup>20, 21</sup>

Se calcula que ocurren más de 100,000 infecciones de coccidioidomicosis cada año en las áreas endémicas de Estados Unidos. En años recientes, la incidencia se ha incrementado en California y Arizona.<sup>22, 23</sup> Las infecciones ocurren más en el verano y el otoño.<sup>24</sup>

En México, la coccidioidomicosis no se considera una enfermedad que deba notificarse obligatoriamente, por lo que actualmente se desconoce su prevalencia en los estados considerados como zonas endémicas.<sup>24</sup>

Las formas diseminadas son favorecidas por factores genéticos y raciales, grupos sanguíneos así como en el segundo y tercer trimestre del embarazo y la administración de glucocorticoides.<sup>24</sup> Entre los latinos la enfermedad sintomática y diseminada está asociada al tipo sanguíneo A y B, respectivamente.<sup>16, 17, 18, 19, 25</sup> Los residentes de áreas endémicas suelen infectarse tempranamente,

pero casi siempre lo hacen en forma subclínica.<sup>22</sup> Por el contrario, los inmigrantes que entran a dicha área experimentan trastornos más severos; de igual forma es severa la micosis en personas que experimentaron una infección inaparente en áreas endémicas pero que años después desarrollan la enfermedad en regiones libres de la coccidioidomicosis donde, debido a su rareza, son diagnosticadas tardíamente.<sup>26</sup>

En México, no se cuenta con datos que indiquen la situación actual de la enfermedad en relación a las tasas de infección y mortalidad, datos que son imprescindibles de conocer para tomar las medidas de precaución necesarias, en pacientes con factores de inmunocompromiso.<sup>4,5</sup>

### **1.1.6 Hábitat y distribución.**

El hábitat del género *Coccidioides* es el suelo, esto fue demostrado por Stewart & Meyer (1932), quienes lo aislaron por primera vez en las inmediaciones de una vivienda en la cual había ocurrido un brote de coccidioidomicosis. Este hallazgo fue comprobado posteriormente por varios autores.<sup>21</sup>

*Coccidioides* desarrolla su ciclo de vida en suelos alcalinos y con altas concentraciones de sales en zonas áridas y semiáridas con estación seca seguida de varios meses de lluvias intermitentes y precipitaciones pluviales reducidas, con temperatura anual promedio de 30°C <sup>28</sup>, presencia de plantas xerófilas como lo son cactáceas, plantas espinosas, arbustos bajos y leñosos. Su presencia esta relacionada a la planta *Larrea tridentata*, la cual es predominante en Sonora Inferior, (arbusto de creosota). En los Estados Unidos esta planta es conocida con el nombre de “gobernadora”, y en Colombia como “chaparral” <sup>21, 29, 30</sup>

La fauna que predomina en las zonas endémicas de coccidioidomicosis, está compuesta por roedores, perros salvajes, zorros, coyotes, serpientes y armadillos.<sup>31</sup>

*Coccidioides* se encuentra en las áreas endémicas de Norte y Centro América y *C. posadasii*, es originaria de Texas, emigró a América Latina. Se ha postulado que en épocas prehistóricas (aproximadamente 14.000 años), la migración tanto del hombre como de animales infectados que llevaban consigo las esférulas, permitió que a su muerte, éstas se convirtieran en la fase micelial, estableciéndose en suelos propicios.<sup>3</sup>

En EUA la zona endémica más importante es el sur, sobre todo Arizona, California, Nevada, Nuevo México, UTA y Texas. En México, la coccidioidomicosis se presenta como continuación de la zona endémica californiana, abarcando una amplia región de tres zonas, una en la franja fronteriza norte, que abarca Chihuahua, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, así como parte de Durango, Zacatecas y San Luis Potosí; una zona en el litoral Pacífico incluye Sonora, Sinaloa y Nayarit, así como una pequeña zona semidesértica entre Colima, Michoacán y Guerrero.<sup>16</sup> La intensidad de la endemia disminuye de norte a sur.<sup>32,33</sup>

También existen zonas endémicas en Guatemala, Honduras, El Salvador; en Venezuela en los estados de Falcón, Lara y Zulia<sup>21</sup>; Paraguay<sup>24</sup>; y en Argentina en el Chaco y la Patagonia.<sup>29,34</sup> Una nueva zona de endemia ha sido descrita recientemente en el noreste de Brasil, en los estados de Piauí y Ceará.<sup>35, 36, 37</sup> En Colombia, no existe una verdadera zona de endemia para la coccidioidomicosis pues solo se han informado casos esporádicos en la Guajira y en el Magdalena, siendo, además, bajos los índices de reactividad a la coccidioidina en estas zonas áridas.<sup>38,39</sup>

### **1.1.7 Patogenia.**

Durante las primeras fases de la infección, las defensas contra el hongo son poco eficaces. Después de aproximadamente tres semanas, la inmunidad específica mediada por células, origina la formación de granulomas epitelioides compactos, con macrófagos activados, que poseen una gran capacidad fagocitaria y lítica. De esta forma, la mayor parte de las infecciones respiratorias, tanto sintomáticas como asintomáticas, son autolimitadas y de curso benigno.<sup>17</sup> Cerca de un 60% de las infecciones agudas no producen síntomas y la enfermedad sólo es reconocida por la prueba de intradermorreacción positiva (IDR+) a la coccidioidina o esferulina.<sup>16,17</sup>

Al igual que en el resto del mundo, en México la coccidioidomicosis grave es de pronóstico frecuentemente fatal, se vincula a condiciones que producen déficit de la inmunidad mediada por células (pacientes diabéticos, mujeres embarazadas, pacientes con SIDA, etc.).<sup>16,17,18,19,25</sup>

### **1.1.8 Histopatología.**

Las esférulas, se pueden observar con la técnica de hematoxilina y eosina, miden 30 a 60 µm, tienen pared gruesa y citoplasma eosinófilo; pueden tener aspecto de cuerpo asteroide por un

fenómeno de Splendore-Hoeppli, en lesiones no activas se deforman y adoptan formas variadas, si se rompen dan salida a endosporas mononucleadas de 2 a 5 micras de diámetro.<sup>8</sup>

En ocasiones las endosporas libres pueden ser confundidas con otras estructuras micóticas como levaduras de *Blastomyces dermatitidis* o con otro tipo de artefactos.<sup>40</sup>

En los pulmones, hay reacción granulomatosa alrededor de la esférula, esta se caracteriza por la presencia de histiocitos y células gigantes tipo cuerpo extraño con linfocitos, células plasmáticas, monocitos, células epiteloides y después fibrosis, caseificación y calcificación.<sup>17</sup>

En los coccidioidomas se observa la cavidad con una pared fibrosa y centro necrótico, pueden encontrarse esférulas e incluso filamentos. En lesiones pulmonares localizadas se señalan granulomas con linfocitos T cooperadores en la parte central y supresores en la periferia. Las lesiones en otros órganos también son granulomatosas y en piel se acompañan además de hiperplasia pseudoepiteliomatosa; a menudo se observa proliferación vascular con eosinofilia.<sup>12</sup>

### **1.1.9 Diagnóstico.**

Para un diagnóstico confiable el médico debe sospechar de la enfermedad, de ello dependerá el tipo de pruebas o análisis que integrarán el protocolo de estudio del paciente. Los hallazgos en las radiografías de tórax o en las imágenes por resonancia magnética, no llegan a confirmar el diagnóstico clínico, por lo que es necesario recurrir al laboratorio microbiológico. Los métodos de diagnóstico son el examen directo de esputo, orina y pus en búsqueda de esférulas y ocasionalmente formas hifales, así como la realización de cultivos en Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) con o sin cicloheximida y Agar Mycobiotic incubados a 25°C por 3 a 15 días.<sup>11, 22</sup>

De los trabajos actuales llevados a cabo en el campo de diagnóstico microbiológico, se encuentra el de Muñoz-Hernández *et al.* (2004), quienes efectuaron el primer reporte documentado de pacientes mexicanos con coccidioidomicosis pulmonar, en donde las formas hifales fueron observadas frecuentemente (15 de 26 pacientes) en sus productos patológicos.<sup>41</sup>

En los estudios anatomopatológicos, la observación de esférulas y/o endosporas en los tejidos del paciente, utilizando las tinciones clásicas (H&E) o especiales (PAS o Grocott), también es diagnóstica, mientras que el hallazgo exclusivo de formas hifales, es solamente sugerente. A nivel

de diagnóstico etiológico, los estudios llevados a cabo en EUA y México orientan a pensar que la especie causante de coccidioidomicosis en nuestro país, es preferentemente *C. posadasii*.<sup>1</sup>

La utilidad de los hemocultivos, mediante la técnica de lisis-centrifugación, ha sido comprobada para el diagnóstico de las formas pulmonares graves acompañadas de enfermedad hepatoesplénica.<sup>16, 17</sup>

La serología es una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico y pronóstico por medio de la detección de anticuerpos anti-*Coccidioides*, las pruebas cutáneas y la prueba de fijación del complemento. Cabe destacar los estudios realizados por Toriello *et al.* (1997), quienes desarrollaron y probaron dos tipos de coccidioidinas (antígenos crudo y purificado), concluyendo que los antígenos crudos (principalmente moléculas glucoprotéicas), muestran buena reactividad en pruebas de precipitación e intradérmicas, mientras que los antígenos purificados (complejo polisacárido-proteína desproteinizado) exhiben mayor grado de especificidad, por lo que su uso debe restringirse a pruebas de alta sensibilidad como ELISA y reacción de fijación del complemento.<sup>42</sup>

#### **1.1.10 Tratamiento.**

Para el tratamiento de la coccidioidomicosis se utilizan los compuestos azólicos: ketoconazol, itraconazol, fluconazol y voriconazol. El polieno anfotericina B (AMB) y sus fórmulas lipídicas (complejo lipídico, dispersión coloidal, liposomal) se usan en las formas más graves. El tratamiento de la coccidioidomicosis en Latinoamérica generalmente consiste en fluconazol o itraconazol y/o AMB. Todos ellos actúan a nivel de la membrana celular fúngica.<sup>22</sup>

La dosis requerida de AMB supera los 2 g sin embargo, se observa gran cantidad de efectos colaterales y de fallas terapéuticas. Los fracasos se producen en las formas pulmonares difusas retículo-nodulillares y en las meningitis.<sup>16, 17</sup>

Se sugiere para el tratamiento la combinación de caspofungina con fluconazol para *C. immitis* como alternativa de tratamiento para aquellos casos que no responden a la AMB. El voriconazol también podría ser útil, ya que posee actividad *in vitro* contra *C. immitis* y tiene buena penetración a sistema nervioso central.<sup>43, 44, 45, 46</sup>

Aunque la mayoría de los individuos infectados se sobreponen sin complicaciones, una minoría se enfrenta a una enfermedad debilitante que conlleva a la falta de opciones terapéuticas

completamente efectivas. Para estas personas y en general, las vacunas representarían una opción preventiva en un futuro no muy lejano.<sup>47</sup>

En nuestro país, se desconoce la proporción de pacientes que responden favorablemente a los tratamientos, así como a qué antifúngico se presenta la mayor resistencia. Para los pacientes con complicaciones graves de la enfermedad (generalmente inmunocomprometidos) el tratamiento es muy costoso y se complica cuando la terapia de la que se dispone, no resulta adecuada.<sup>4, 20</sup>

## **1.2 Antecedentes del modelo experimental.**

En la actualidad, el modelo experimental representa una herramienta útil para la elucidación y comprensión de la patogénesis, la resistencia del hospedero y a la búsqueda de terapias antifúngicas eficaces.

Se han empleado perros, conejos, cobayos y ratas en baja frecuencia para estudiar la respuesta del hospedero y la eficacia de vacunas. Sin embargo, el costo y el aumento de las necesidades de cuidado y cría de animales son las limitantes.<sup>48</sup>

### **1.2.1 El modelo murino.**

El modelo murino es el más utilizado en el estudio de la coccidioidomicosis debido a la disponibilidad de las cepas genéticamente definidas, reactivos inmunológicos, su facilidad de manejo y los gastos, entre los más destacados se encuentran: el de enfermedad primaria pulmonar por inoculación intranasal, enfermedad con diseminación por inoculación intraperitoneal, enfermedad sistémica por inoculación intravenosa y el de infección meníngea por inoculación intracraneal o intratecal. Cada uno ha sido utilizado para examinar diversos aspectos de la resistencia del hospedero, patogenia, o terapia antifúngica.<sup>48</sup>

Los modelos sistémicos mencionados emplean métodos invasivos para generar la enfermedad, los cuales por sí mismos son capaces de generar daño. Los ratones empleados son hembras, que además de ser más resistentes a la enfermedad, tienen variaciones hormonales.<sup>48-50</sup> También se han manejado cepas “outbred”, esto es con reproducción no consanguínea, lo cual produce variaciones genéticas que por lo tanto también podrían repercutir en la respuesta del hospedero. Por último, los modelos se han diseñado empleando en su mayoría a *C. immitis* (ATCC 288868), y no aislamientos clínicos mexicanos, lo cual puede producir diferencias tanto en la respuesta del hospedero, como en la patogenia debido a diferencia en la virulencia del hongo.

## **2. JUSTIFICACIÓN.**

En la actualidad no se cuenta con un modelo experimental, que elimine las variaciones hormonales y que mantenga una baja variación genética, además, no se han realizado estudios empleando cepas mexicanas de *Coccidioides posadasii* y por esta razón, aún se desconocen muchos aspectos de la patogenia e histopatología de esta enfermedad. Por lo anterior, se propone un modelo murino experimental que representará una herramienta útil para la elucidación y comprensión de la patogénesis y resistencia del hospedero a la infección, tanto como para la búsqueda de terapias antifúngicas más eficaces.

### **3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.**

¿Es posible desarrollar un modelo murino, de tal modo que se puedan estudiar las alteraciones histopatológicas, microbiológicas y ultraestructurales, para conocer el desarrollo de la infección sistémica por *C. posadasii*?

### **4. HIPÓTESIS.**

Mediante la inoculación de *C. posadasii* por vía intranasal, es posible desarrollar en un modelo murino la infección sistémica. Lo anterior hace posible estudiar las alteraciones histopatológicas, microbiológicas y ultraestructurales.



## **5. OBJETIVO GENERAL.**

Desarrollar un modelo murino de coccidioomicosis sistémica capaz de reproducir el síndrome característico de esta enfermedad en humanos.

### **5.1 Objetivos particulares.**

- Probar diferentes dosis de artroconidios de una cepa mexicana de *C. posadasii* para desarrollar el modelo murino de coccidioomicosis sistémica.
- Estudiar los cambios anatomopatológicos e histopatológicos de la enfermedad.
- Conocer las características microbiológicas de *C. posadasii* obtenido a partir de los tejidos infectados.

## 6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Todo el procedimiento, excepto la histología, se realizó en las instalaciones del bioterio de El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, cumpliendo con la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Todo el procedimiento se llevó a cabo en un gabinete de seguridad biológica nivel III. El protocolo empleado, está aceptado por El Comité de Ética para la Experimentación en Animales del mismo Instituto. El desarrollo experimental se resume en la figura 3.

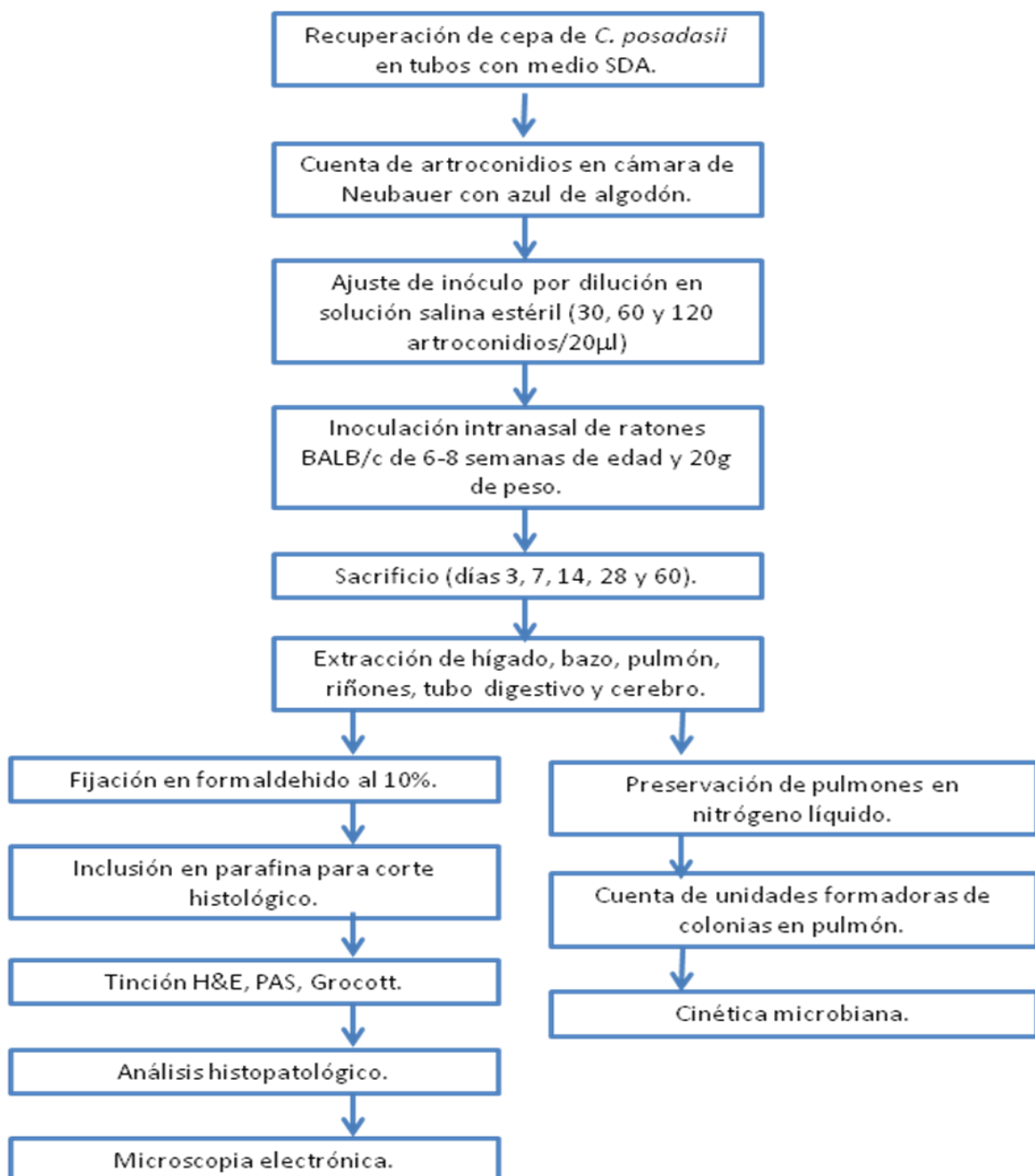


Figura 3.- Diagrama general de trabajo.

## **6.1 Material y métodos.**

### **6.1.1 Inóculo.**

#### **6.1.1.1 Recuperación de la cepa**

Se trabajó con una cepa de referencia de *Coccidioides posadasii* donada por la Dra. Gloria González del Departamento de Microbiología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (90UANL), aislada en un área endémica de México. Se recuperó en tubos con Sabouraud dextrosa agar (SDA) incubadas a 28° C por 15 días.

#### **6.1.1.2 Obtención de inóculo.**

Se agregó solución salina estéril isotónica (SS) a un cultivo de 15 días de *C. posadasii* (evitando crear aerosoles). Los arthroconidios se desprendieron por movimiento suaves. Se tomó el sobrenadante y se centrifugó para obtener un botón, el cual fue lavado 5 veces con SS. Posteriormente, los arthroconidios fueron resuspendidos en 1 mL de SS para realizar una cuenta en cámara de Neubauer con azul de algodón.

Se realizaron diluciones para obtener inóculos con intervalos aproximados de 30, 60 y 120 arthroconidios por cada 20 µL de SS.

Las diluciones, incluyendo el primer tubo, se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta el día de la inoculación.

Los inóculos fueron verificados por cultivo en placa con SDA por duplicado de 20 µL de cada dosis.

#### **6.1.1.3 Inoculación.**

Se inocularon tres grupos de quince ratones BABL/c macho de 6-8 semanas de edad y con 20 g de peso con los inóculos de: 30 arthroconidios/20 µL, 60 arthroconidios/20 µL y 120 arthroconidios/20 µL en SS. Cada ratón se anestesió con 100 µL de Sevoflurano® en una cámara de 20x15x15 cm. Un solo inóculo de 20 µL se repartió en ambos orificios nasales usando material estéril, en campana de bioseguridad N3. Se esperó a que cada ratón aspirara el inóculo y se recuperara de la anestesia. Se repartieron en cajas con un máximo de 10 ratones cada una. Todos los ratones contaron con agua y comida abundante, con cambio periódico de cama y fotoperiodos estándar (12 por 12).

### **6.1.2 Sacrificio.**

Se realizó el sacrificio de tres animales por grupo los días 3, 7, 14, 28 y 60 después de la inoculación. Cada ratón se anestesió con éter-etílico, se inmovilizó y se sangró en blanco. Se expusieron las vísceras y se extrajeron en el siguiente orden: hígado, bazo, riñón izquierdo, riñón derecho, tubo digestivo y cerebro.

Los pulmones se dividieron a la mitad y se congelaron con nitrógeno líquido en criotubos estériles para la cuenta de unidades formadoras de colonias. La otra mitad junto con los demás órganos fueron preservados en formaldehído al 10% para la realización de cortes histológicos.

### **6.1.3 Cuenta de unidades formadoras de colonias en pulmón.**

Las muestras congeladas se llevaron a temperatura ambiente y a cada uno se les agregó regulador de fosfatos (estéril) hasta obtener un volumen de 0.5mL. Posteriormente fueron homogenizadas y se llevó a un volumen final de 1mL con el regulador de fosfatos. Se realizaron diluciones decimales con regulador de fosfatos en microplacas estériles de 96 pozos y se sembraron 20µL en placas Petri con medio Mycobiotic. Se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y se contaron las colonias después de cuatro días.

### **6.1.4 Histología.**

Los órganos fijados con formaldehído al 10% se deshidrataron con diferentes grados de alcohol y xilol. Se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 3 a 5 micras de grosor. Los cortes se montaron en portaobjetos para su tinción con las técnicas de hematoxilina y eosina (H&E), ácido periódico de Schiff (PAS) y Grocott (TG).

#### **6.1.4.1 Análisis histopatológico.**

Cada laminilla fue observada y evaluada de forma cualitativa respecto al daño histopatológico. Se realizó la morfometría de pulmones y la microscopía electrónica de las laminillas de interés .

#### **6.1.4.2 Morfometría de pulmón.**

Los cortes de pulmón fueron examinados con el analizador de imágenes IM1000® adaptado a un microscopio óptico Leica. Se midió el daño histopatológico con respecto al área total de tejido.

#### **6.1.4.3 Microscopía electrónica.**

Después de observar los cortes histológicos, se seleccionaron aquellos con características de interés y se tomaron muestras en los bloques de parafina de los cuales provienen. Se desparafinaron con calor y solventes orgánicos. Posteriormente, se incluyeron en resina. Se realizaron cortes finos de 90 a 100 nm, se montaron en rejillas de cobre y se contrastaron con una solución saturada de acetato de uranilo y citrato de plomo de Ronald para su análisis al microscopio electrónico.

## **7. RESULTADOS.**

Se recuperó la cepa de referencia 90 UANL de *C. posadasii* en tubos de SDA. El crecimiento fue lento. Se hicieron cultivos en placas Petri para observar su morfología, la cual fue típica, es decir, las colonias que produce son blancas grisáceas por el anverso, algodonosas que se volvieron pulverulentas por la producción de artroconidios, umbilicadas con pliegues radiales y reverso color crema. Microscópicamente presentó micelio septado con producción de artroconidios típicos en forma de barril y células disyuntivas. Los artroconidios se desarrollaron a partir del día siete de crecimiento.

Los artroconidios fueron obtenidos y contados según la metodología descrita. Se realizaron diluciones para obtener los inóculos de 30, 60 y 120 artroconidios. Estos fueron verificados por en cultivo en placa con SDA. Las diluciones, incluyendo el primer tubo, se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta el día de la inoculación.

### **7.1 Modelo con inóculo de 120 artroconidios.**

El grupo de ratones cuya inoculación fue de 120 artroconidios de la cepa 90UANL de *C. posadasii*, mostró los siguientes hallazgos histopatológicos.

#### **7.1.1 Pulmón.**

En el parénquima pulmonar se observó una respuesta inflamatoria a expensas de células mononucleares en el sacrificio del día 3, en el sacrificio del día 7 además se presentó hemorragia y congestión vascular. El día 14 se visualizó la progresión de las lesiones con la producción de abscesos con necrosis e inflamación por células mixtas y destrucción tisular con vasculitis, edema y fibrosis. Dentro de estas lesiones se encontraron esférulas de *C. posadasii* en diferentes estadios de maduración. En el sacrificio del día 28 las lesiones únicamente son hemorragia, inflamación y vasculitis, mientras que el día 60 el tejido pulmonar contiene hemorragia, congestión e inflamación leve (figura 4).

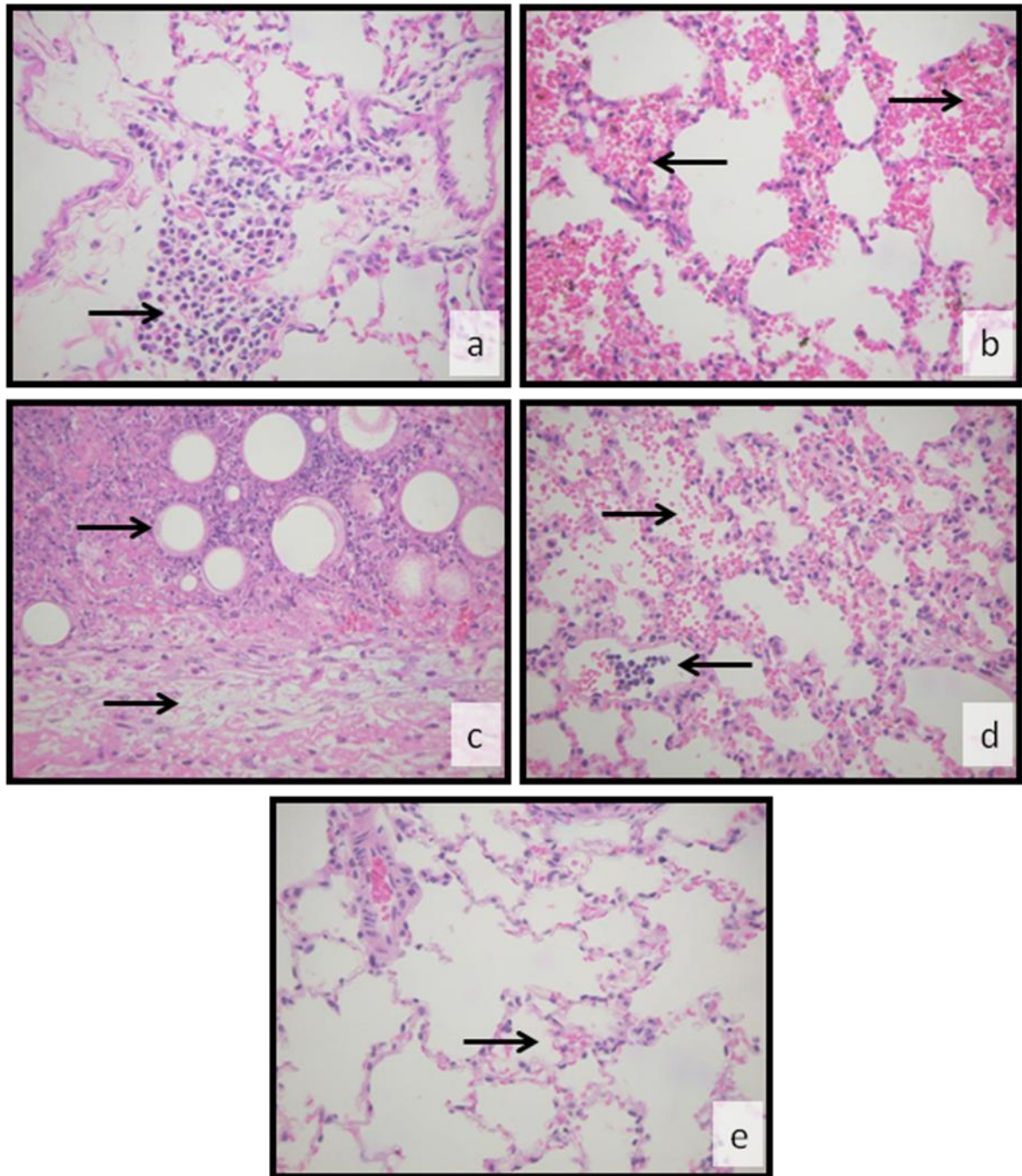


Figura 4.- Hallazgos histopatológicos en pulmón con el inóculo de 120 arthroconidios. a) Día 3, inflamación; b) Día 7, hemorragia e inflamación; c) Día 14, absceso, esférulas en diferentes estadios de maduración (flecha), fibrosis; d) Día 28, inflamación, hemorragia moderada y congestión; e) Día 60, congestión vascular e inflamación leve. (H&E x400).

### 7.1.1.1 Morfometría de pulmón.

De acuerdo a la metodología, se midieron las lesiones histopatológicas por área de tejido pulmonar en cada laminilla analizada. Se observó que al emplear la dosis de 120 artroconidios, el porcentaje de inflamación al día 3 del experimento fue de 0.51%, en el día 7 la hemorragia se presentó en el 28.78% del tejido. El mayor porcentaje de inflamación (55.19%), hemorragia (41.35%), edema (83.5%) y absceso (24.18%) en pulmón, se presentó el día 14. En el día 28 se presentó una inflamación del 10% y absceso en el 0.22 % del parénquima pulmonar y en el día 60, el 0.14% del tejido.(figura 5).

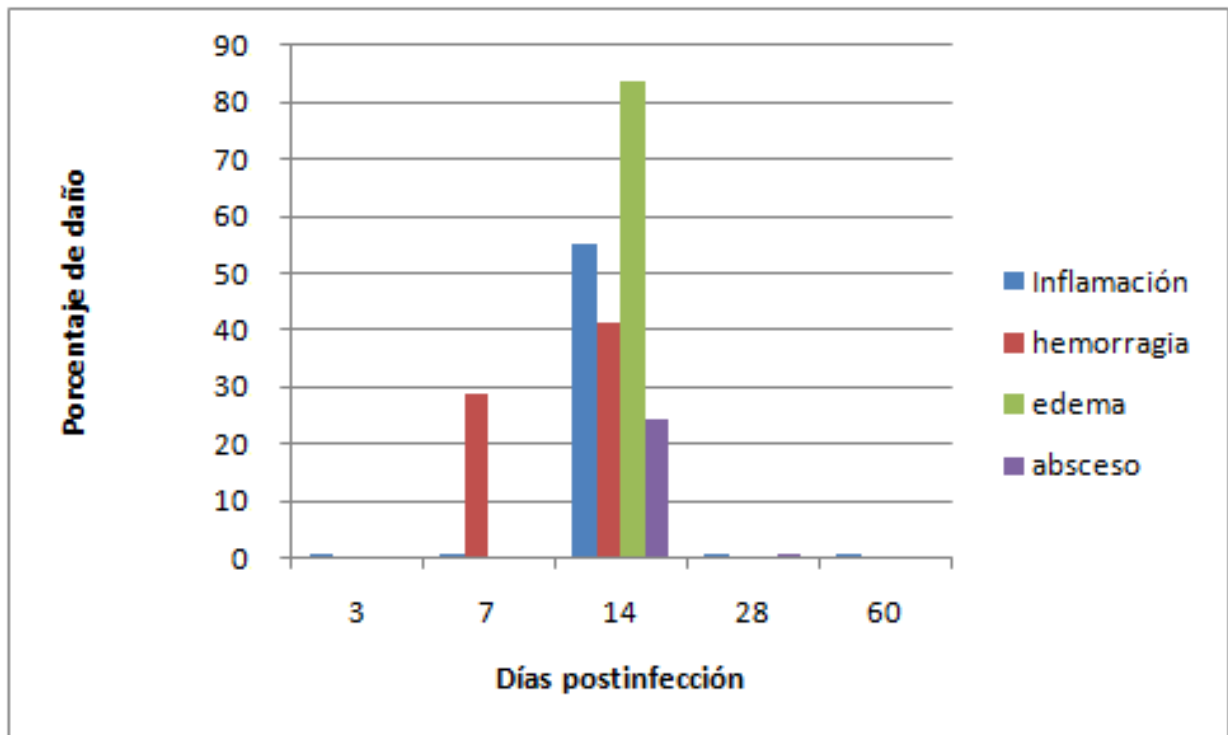


Figura 5.- Morfometría de pulmón con el inóculo de 120 artroconidios. Los resultados de las lesiones histopatológicas se presentan en porcentajes. Se observa que el mayor de ellos se presenta el día 14 posterior a la inoculación.



### 7.1.1.2 Cultivo y cuenta de unidades formadoras de colonias.

La infección pulmonar se comprobó por medio del cultivo micológico como anteriormente se ha descrito y se construyó la cinética microbiológica que se describe en la figura 6. Para el inóculo de 120 arthroconidios únicamente fueron detectables 106.66 UFC/pulmón en el día 14 (figura 6).

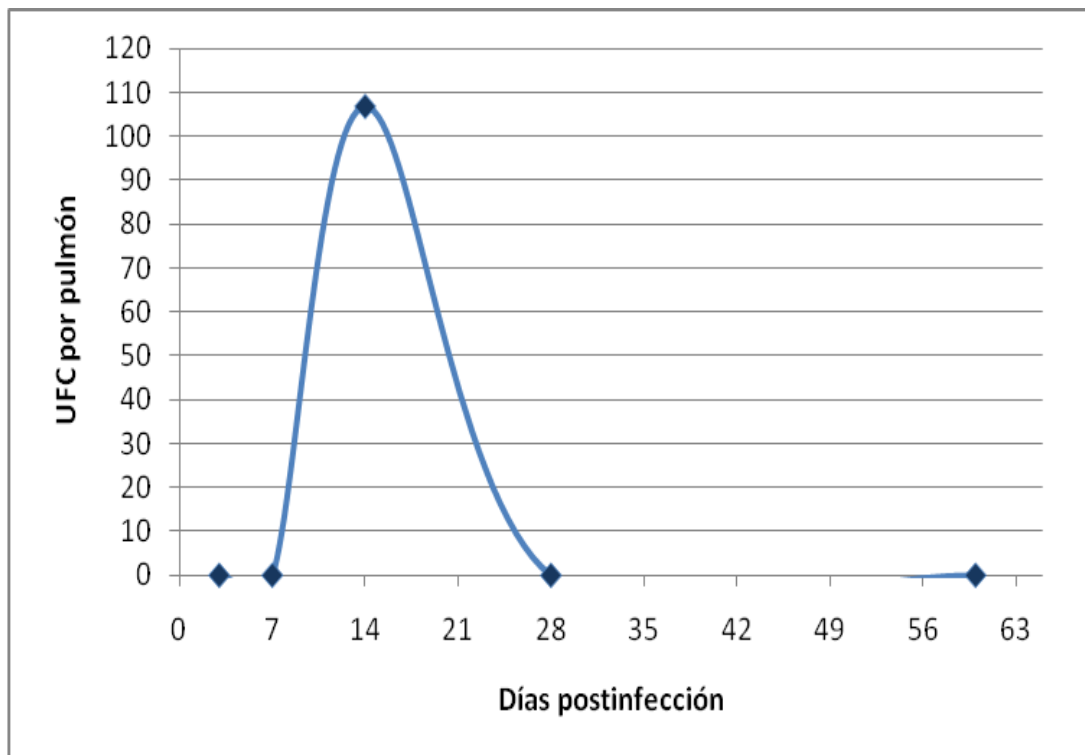


Figura 6.- Cuenta de unidades formadoras de colonias en pulmón con el inóculo de 120 arthroconidios. Los resultados se muestran en unidades formadoras de colonias por pulmón.

### 7.1.2 Hígado.

En el parénquima hepático, al día 3 de posinfección, se observó hemorragia y necrosis centrolobulillar, mientras que al día 7 solamente se encontró congestión vascular. El día 14 además de congestión vascular, se observaron abscesos. En el día 28, es posible observar necrosis en los abscesos y al día 60 se observa congestión e inflamación leve (figura 7).

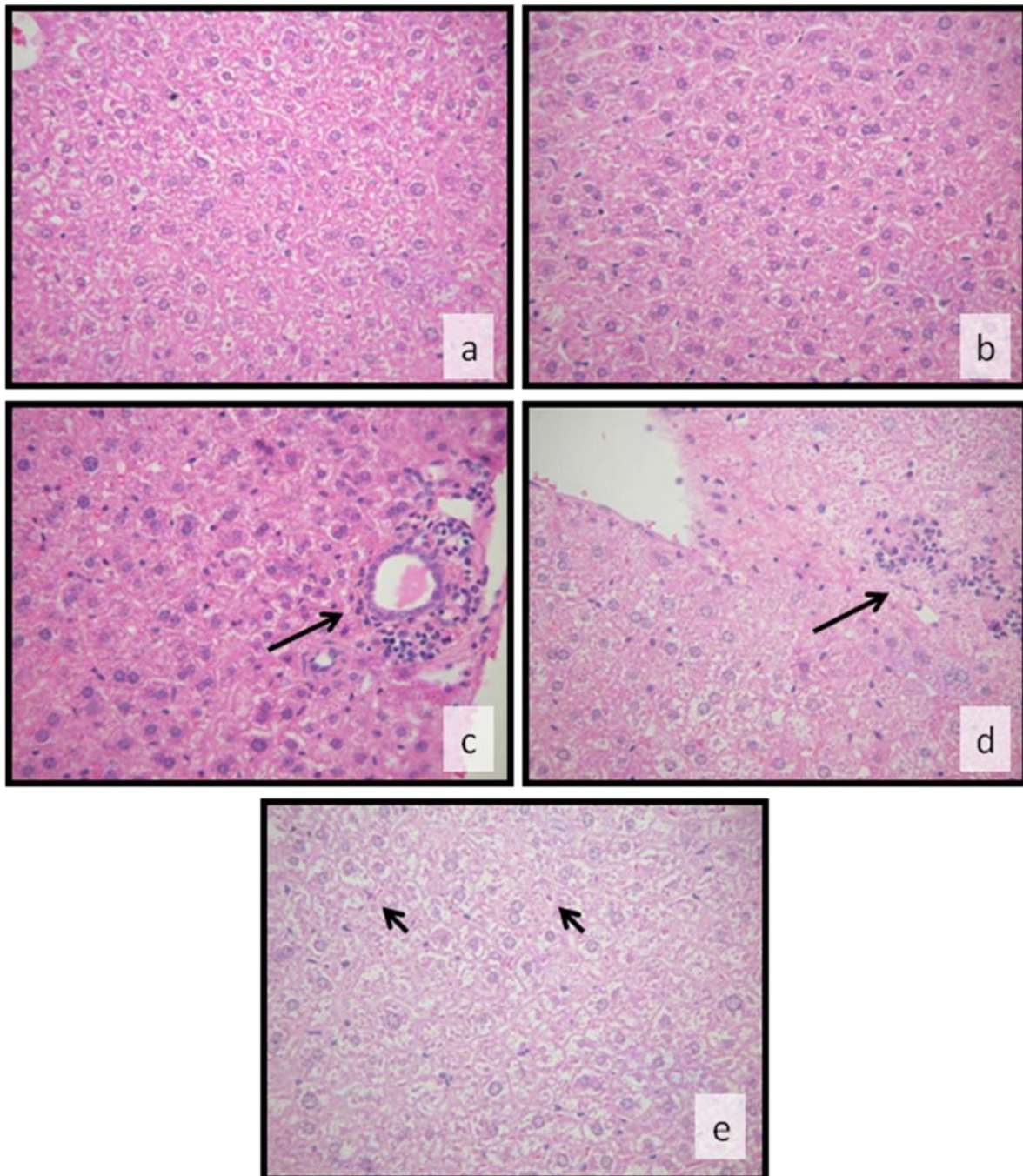


Figura 7.- Hallazgos histopatológicos en hígado con el inóculo de 120 artroconidios. a) Día 3 y b) Día 7, Tejido sin lesión; c) Día 14, necrosis centrolobulillar; d) Día 28, inflamación y congestión; e) Día 60, congestión. (H&E x400).

### 7.1.3 Bazo.

Durante el desarrollo del experimento, fue posible observar la progresión de la hiperplasia de la pulpa blanca en bazo con la presencia franca de centros germinales en los folículos linfoides, lo cual se demuestra en las microfotografías de la figura 8. El día 28 se observó además esplenomegalia en uno de los tres animales sacrificados (figura 8a).

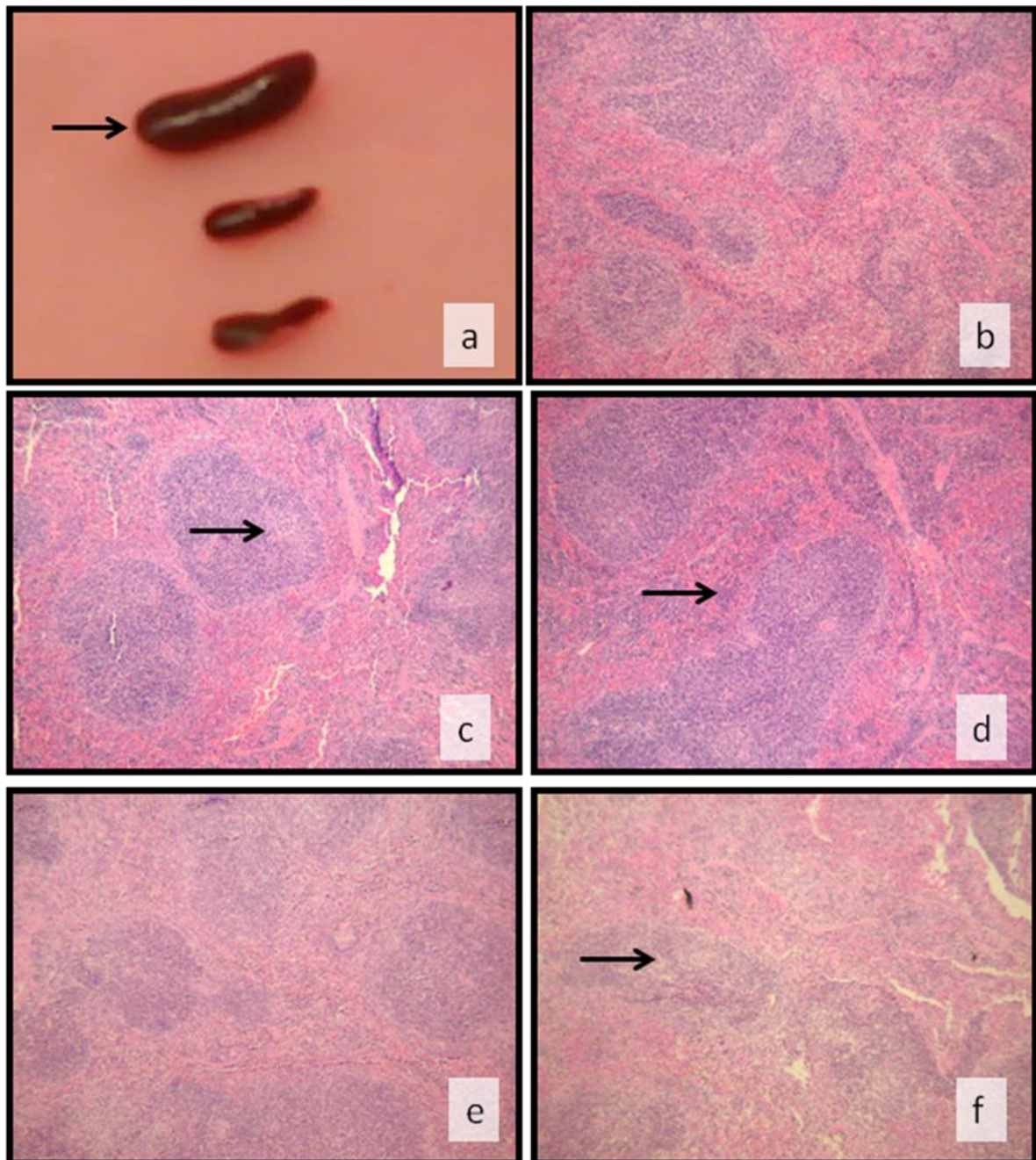


Figura 8.- Hallazgos histopatológicos en bazo con el inóculo de 120 artroconidios. a) Esplenomegalia en el día 28. b) Día 3, c) Día 7 y d) Día 14, hiperplasia de centros germinales; e) Día 28 y f) Día 60, hiperplasia marcada de centros germinales. (H&E x100).



#### 7.1.4 Corazón.

Durante los días 3 y 7 del experimento, fue posible observar congestión en el tejido cardiaco, y el día 14 se presentó pericarditis con células mononucleares (figura 9a).

#### 7.1.5 Riñones.

Durante el desarrollo del experimento, se observó inflamación leve por células mononucleares en la pelvis renal de todos los animales (figura 9b). El día 14, además de esta lesión, se observó congestión vascular.

#### 7.1.6.1 Tubo digestivo.

A pesar de que se mostró el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso, no se observaron lesiones en ninguno de ellos.

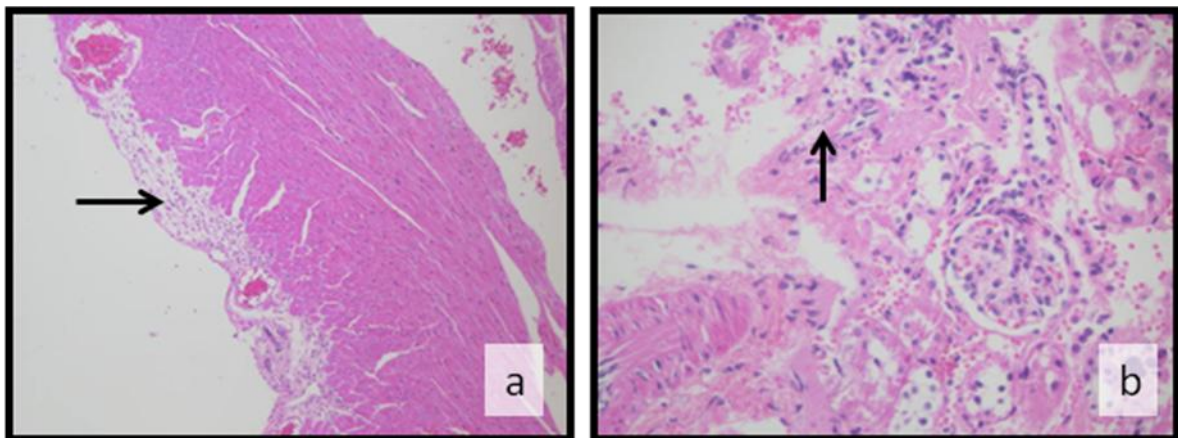


Figura 9.- Hallazgos histopatológicos en corazón y riñón con el inóculo de 120 artroconidios de inóculo. a) Pericarditis H&E x100; b) Inflamación de pelvis renal H&E x400.

### 7.1.7 Cerebro.

Durante el desarrollo del experimento, los cortes de cerebro no mostraron lesiones histopatológicas ni presencia de esférulas u otras formas fúngicas (figura 10). Cabe mencionar que durante la autopsia, no se observaron lesiones macroscópicas.

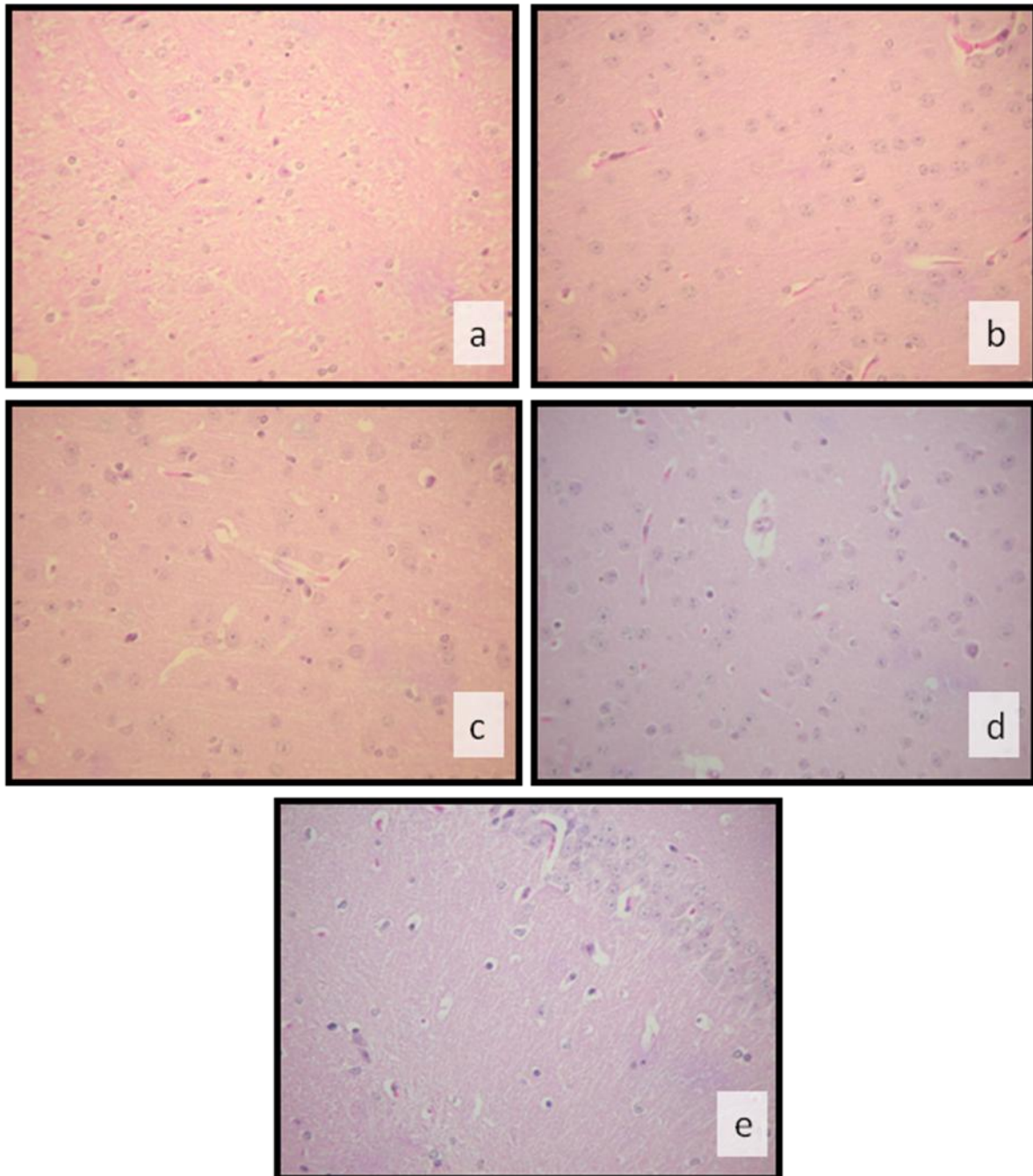


Figura 10.- Hallazgos histopatológicos en cerebro con el inóculo de 120 arthroconidios. a-e) Días 3, 7, 14, 28 y 60 respectivamente, el tejido no muestra lesiones. (H&E x400).

## **7.2 Modelo con inóculo de 60 artroconidios.**

En los ratones que fueron inoculados con 60 artroconidios de la cepa 90UANL de *Coccidioides posadasii*, se encontraron los siguientes hallazgos histopatológicos.

### **7.2.1 Pulmón.**

El tejido pulmonar presentó hemorragia al día 3 después de la inoculación, la cual se encontró disminuida al día 7. En el día 14 solo se observó congestión del parénquima pulmonar y en el día 28 se presentó inflamación abundante con células mixtas, fibrosis, células epitelioides y células gigantes, en este día fue posible observar esférulas en diferente estadio de maduración, algunas de ellas fagocitadas por células gigantes como lo demuestra la microfotografía de la figura 11d. En el día 60 se observa que la inflamación ha disminuido, además se observa también la presencia de edema y congestión. Esta descripción, se puede notar en la figura 11.

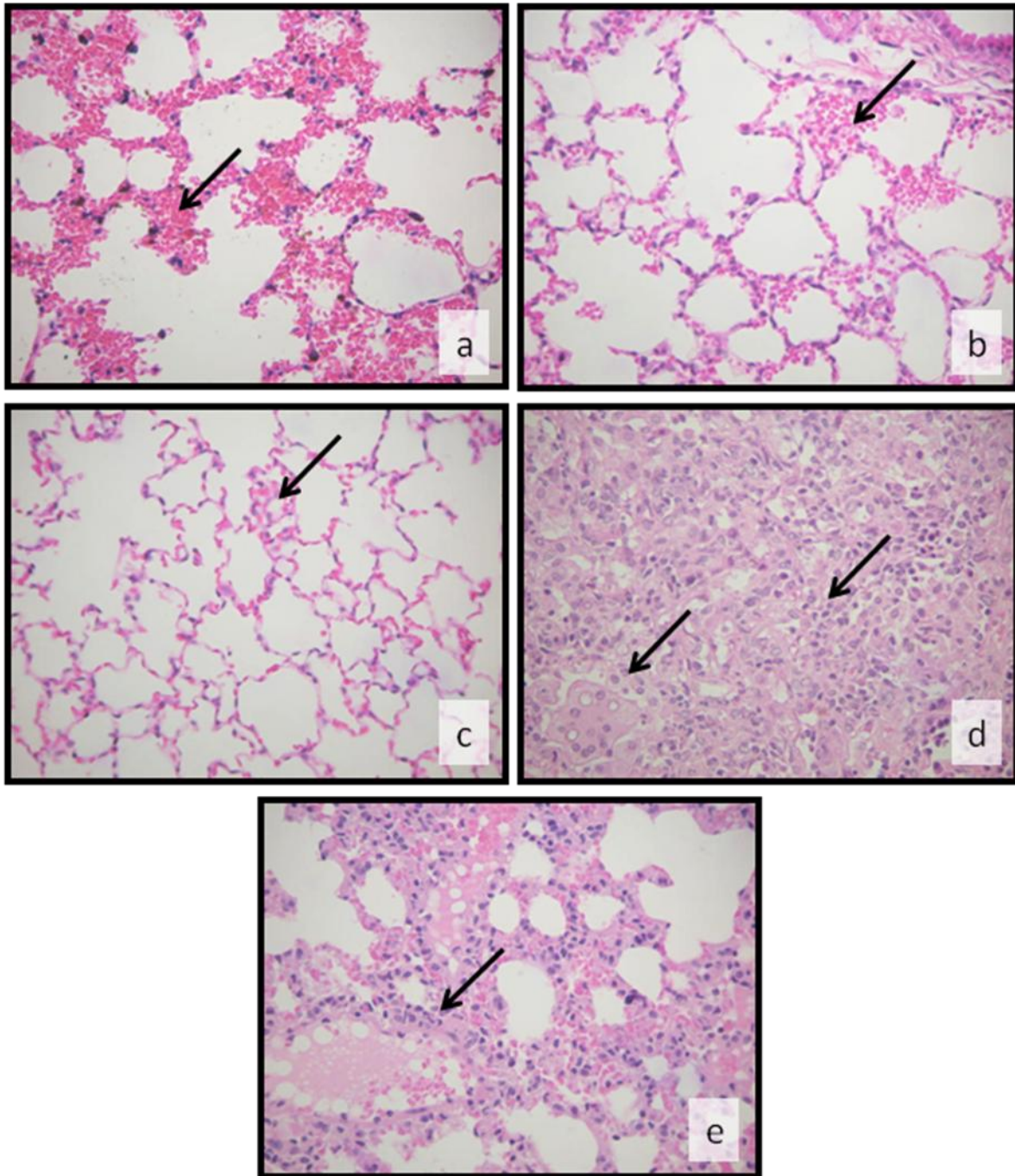


Figura 11.- Hallazgos histopatológicos en pulmón con el inóculo de 60 artroconidios. a) Día 3, hemorragia extensa; b) Día 7, hemorragia e inflamación leves; c) Día 14, congestión; d) Día 28, inflamación, fibrosis y células gigantes; e) Día 60, edema e inflamación moderada con congestión. (H&E x400).

### 7.2.1.1 Morfometría de pulmón.

Después de realizar la morfometría de pulmón, se observó que con el inóculo de 60 artroconidios, se presenta un 0.10% de inflamación y 65.35% de hemorragia. El día 7 mostró 0.05% de inflamación. El día 14 no se detectaron lesiones. El mayor porcentaje de inflamación (90.51%), edema (13.17%) y absceso en pulmón (9.66%), se presentaron preferentemente durante el día 28, mientras que el día 60 se presentó 77.32% de inflamación en el parénquima pulmonar (figura 12).

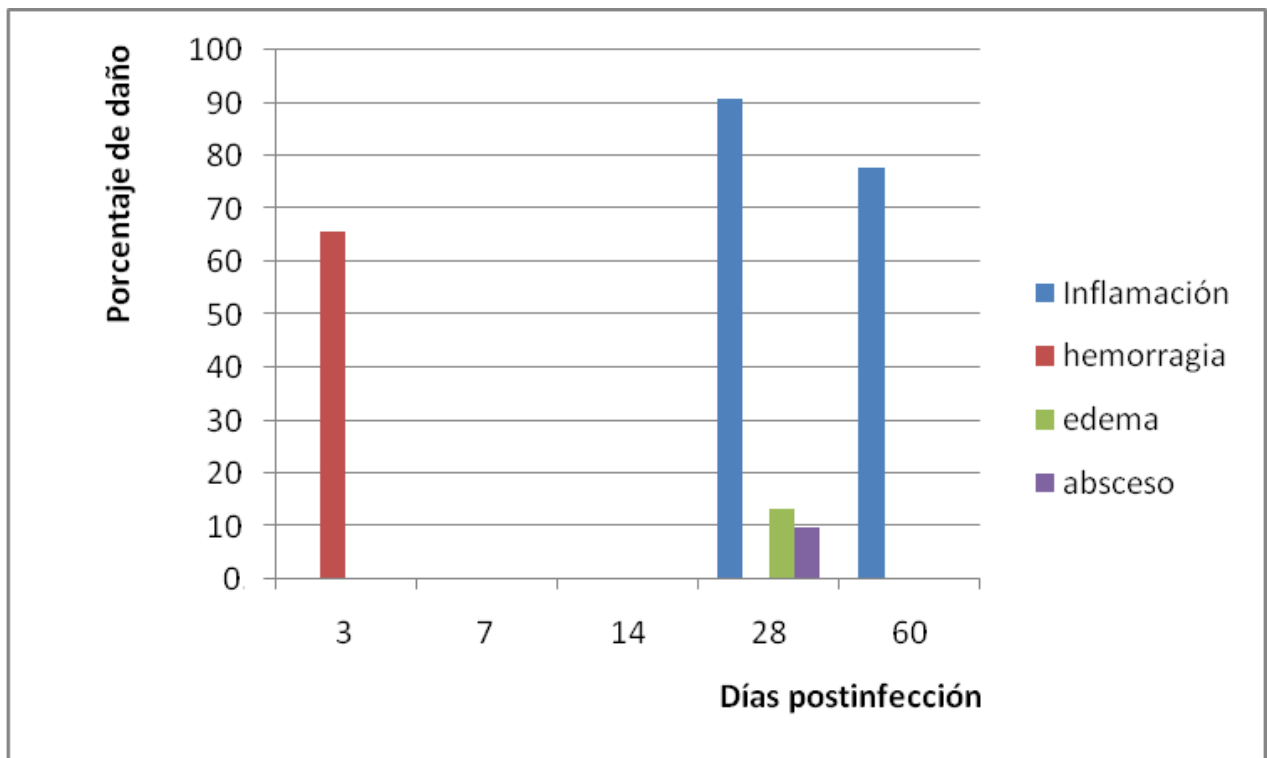


Figura 12.- Morfometría de pulmón con el inóculo de 60 artroconidios. La mayor parte de las lesiones evaluadas, se presentan el día 28. La hemorragia (rojo) además se presenta el día 3. La inflamación (azul) se presenta también el 60.



### 7.2.1.2 Cultivo y cuenta de unidades formadoras de colonias.

La infección pulmonar con el inóculo de 60 artroconidios, se comprobó por medio del cultivo según la metodología previamente descrita y se construyó la cinética microbiológica que se muestra en la figura 13. En ella se puede observar que el microorganismo únicamente se detecto el día 28 con 61 UFC por pulmón.

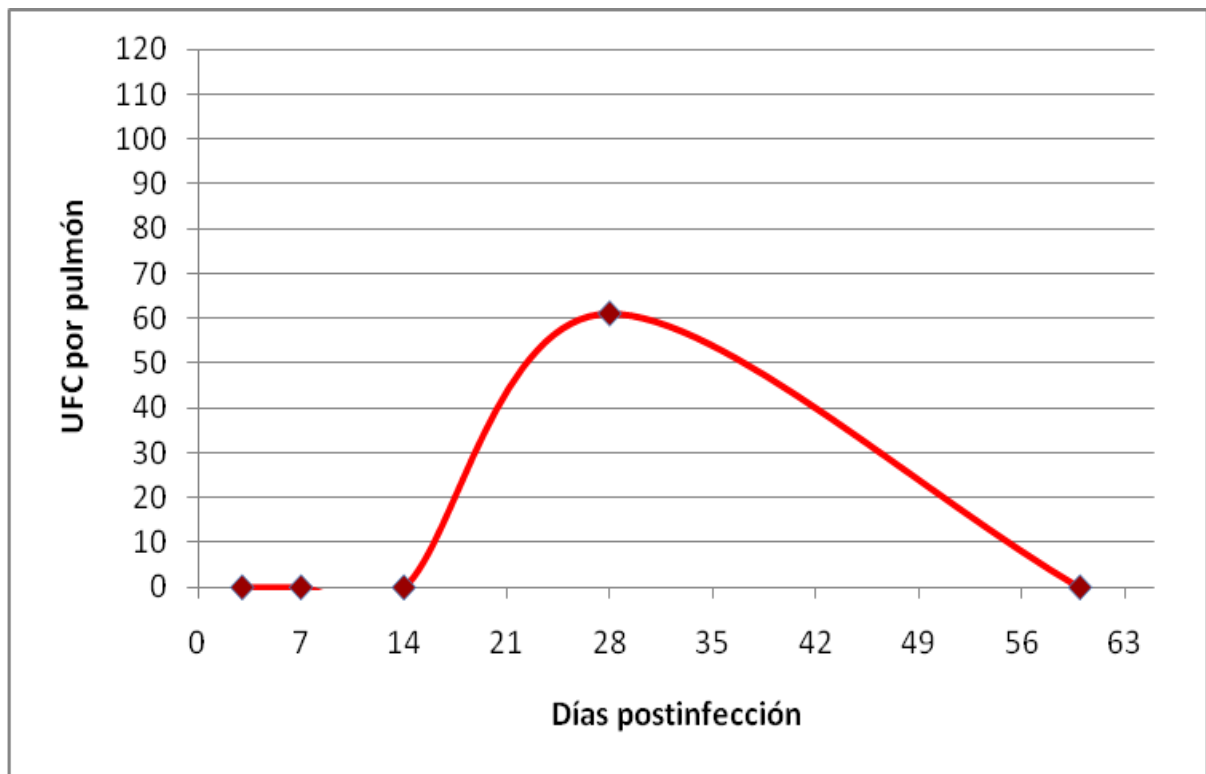


Figura 13.- Cuenta de unidades formadoras de colonias en pulmón con el inóculo de 60 artroconidios. Los resultados se muestran en unidades formadoras de colonias por pulmón.

### 7.2.2 Hígado.

Durante el análisis del día 3, se observó necrosis centrolobulillar y congestión vascular en uno de los ratones mientras que el hígado de los demás ratones no mostró lesión alguna. En el día 7 del experimento, la congestión vascular fue general y en el día 14 se encontró además esteatosis de gota fina, y dilatación sinusoidal. En el día 28 fue posible observar esférulas con endosporas rodeadas por inflamación con producción de abscesos con necrosis y congestión del tejido. En el día 60 el tejido solamente presentó inflamación leve (ver figura 14).

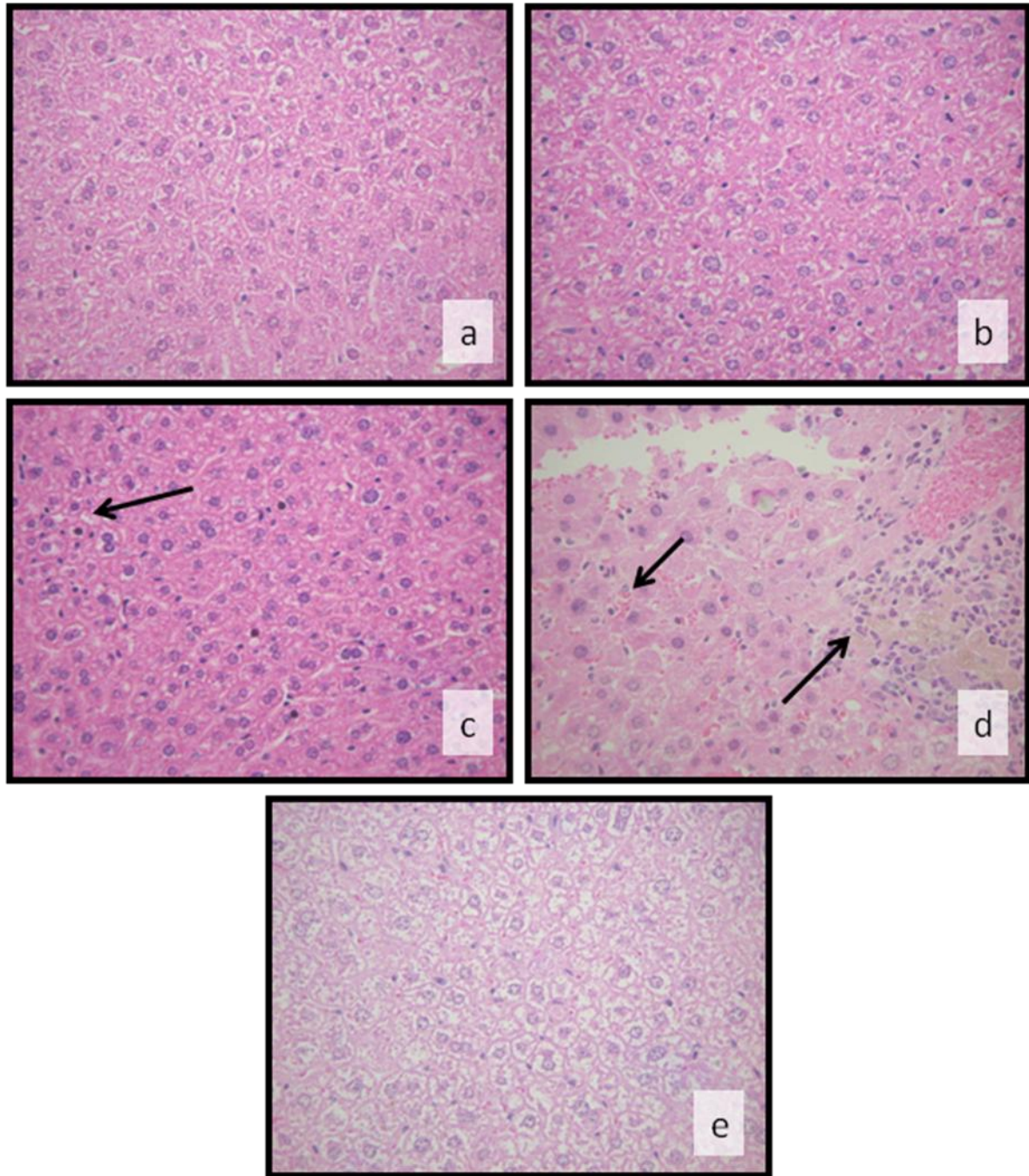


Figura 14.- Hallazgos histopatológicos en hígado con el inóculo de 60 artroconidios. a y b) Días 3 y 7 respectivamente, tejido sin lesiones; c) Día 14, esteatosis de gota fina; d) Día 28, inflamación, absceso con necrosis y congestión; e) Día 60, tejido sin lesiones. (H&E x400).

### 7.2.3 Bazo.

Al igual que con el modelo anterior, es posible ver la progresión de la hiperplasia de pulpa roja y folículos linfoides con centro germinativo; sin embargo este es evidente el día 7 (figura 15). El día 28 de la infección fue evidente la esplenomegalia en uno de los tres animales sacrificados (figura 15a).

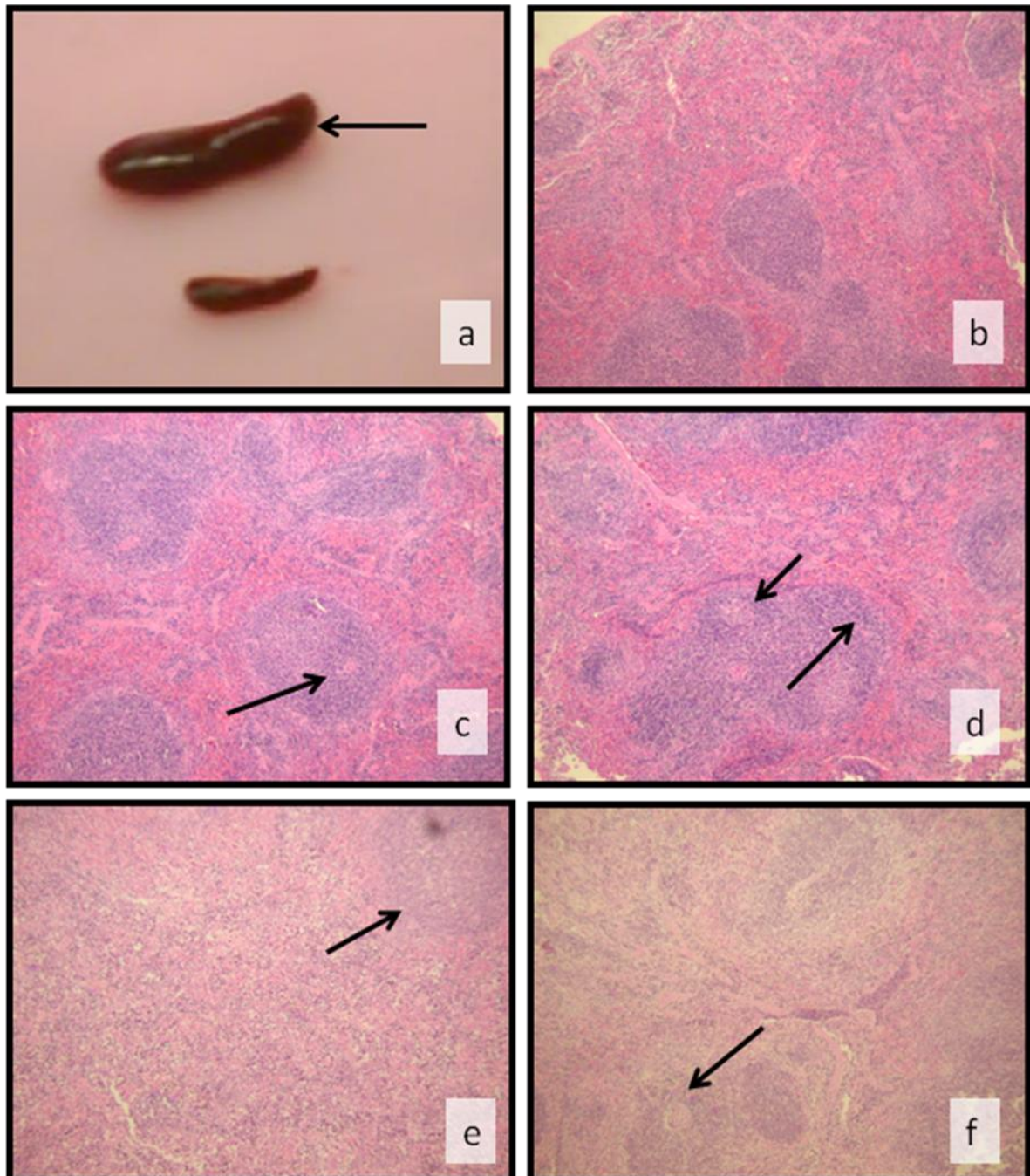


Figura 15.- Hallazgos histopatológicos en bazo con el inóculo de 60 artroconidios. a) Esplenomegalia en el día 28. b) Día 3, tejido normal; c y d) Días 7 y 14 respectivamente, hiperplasia leve de los centros germinales; e y f) Día 28 y 60 respectivamente, hiperplasia marcada de los centros germinales. (H&E x100).



#### 7.2.4 Riñones.

Se observó inflamación leve por mononucleares de pelvis renal durante el desarrollo del experimento con congestión vascular el día 14.

#### 7.2.5. Corazón, tubo digestivo y cerebro.

El corazón y tubo digestivo no presentaron signo alguno de lesión en ningún día del experimento. De igual forma, el cerebro no presentó lesión como lo muestra la figura 16.

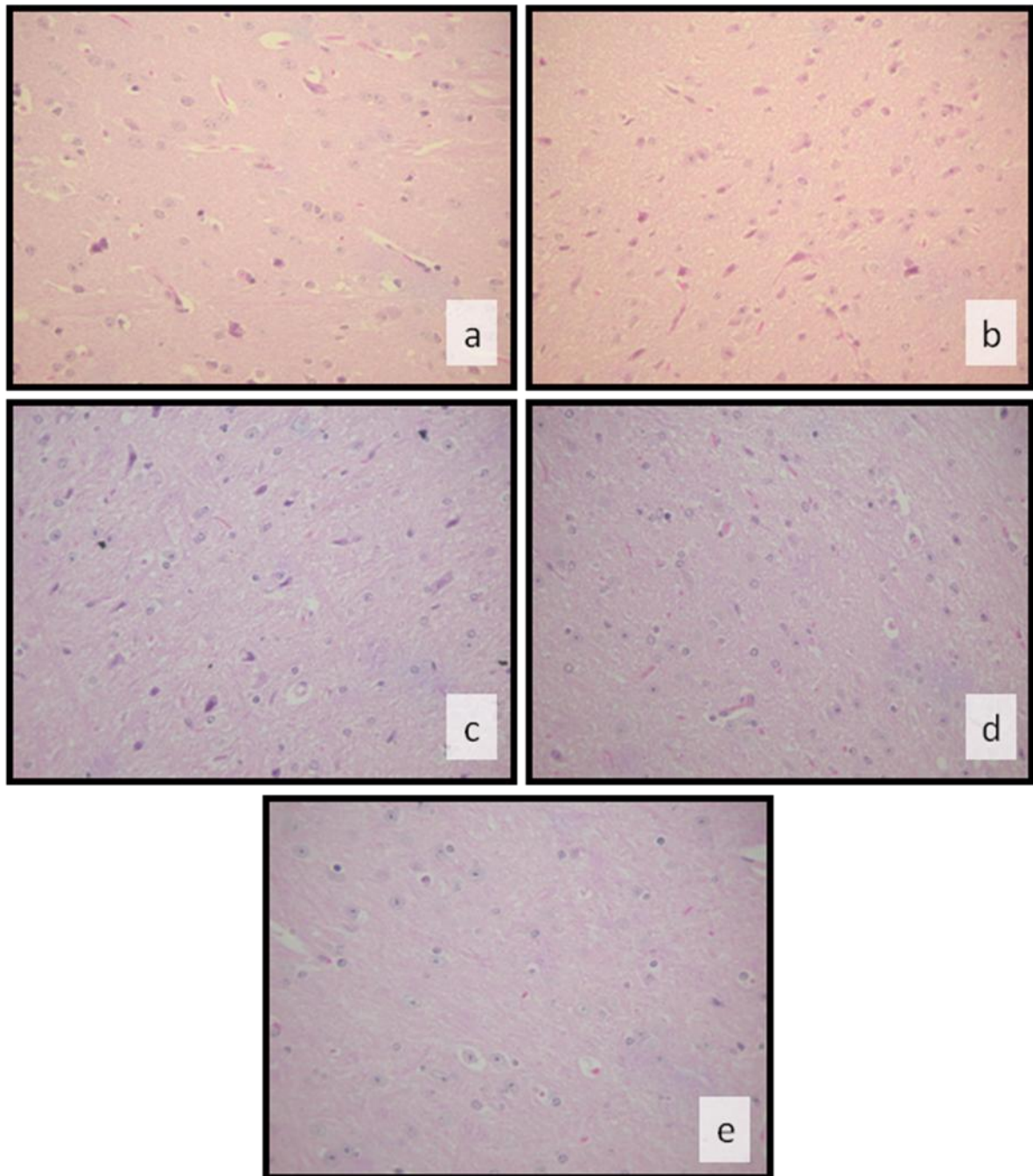


Figura 16.- Hallazgos histopatológicos en cerebro con el inóculo de 60 artroconidios. a-e) Días 3, 7, 14, 28 y 60 respectivamente, tejido normal. (H&E x400).

### **7.3 Modelo con inóculo de 30 artroconidios.**

El grupo de ratones que fueron inoculados con 30 artroconidios de la cepa 90 UANL de *Coccidioides posadasii*, presentaron los siguientes hallazgos histopatológicos.

#### **7.3.1 Pulmón.**

Las lesiones pulmonares muestran hemorragia, edema e inflamación por células mononucleares, mientras que en el día 7 y 14, se observó inflamación por células mononucleares y congestión vascular. En el día 28 la inflamación predomina con fibrosis y esférulas de *C. posadasii* en diferentes estadios de maduración. Al día 60 del experimento, se presentó inflamación moderada. Estos hallazgos pueden observarse en la figura 17.

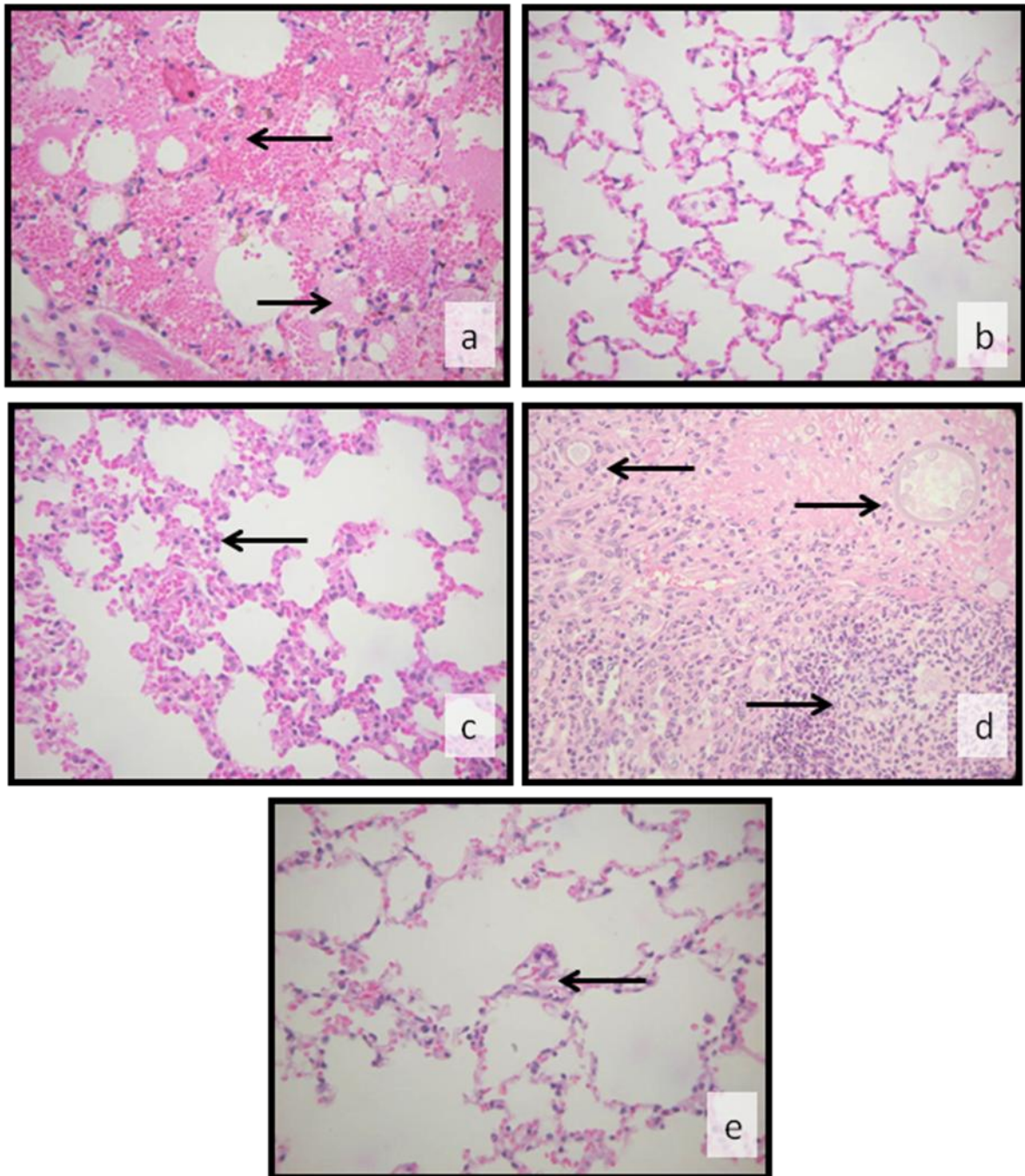


Figura 17.- Hallazgos histopatológicos en pulmón con el inóculo de 30 arthroconidios. a) Día 3, hemorragia, edema e inflamación por mononucleares; b) Día 7, congestión e inflamación leve; c) Día 14, congestión e inflamación moderada con edema leve; d) Día 28, inflamación y fibrosis con esférulas en diferentes estadios de maduración; e) Día 60, inflamación moderada. (H&E x400).

### 7.3.1.1 Morfometría de pulmón.

Tras la inoculación de 30 artroconidios se observó que en el día 3 la inflamación se encuentra en el 0.20% del parénquima pulmonar, la hemorragia en el 98.54% y el edema en el 77.83%, mientras que en el día 14 hay 40.66% de inflamación y en el día 28 existe 75.8% de inflamación, 15.19% de edema y 7.5% de tejido con abscesos. En el día 7 y 60 no se detectaron las lesiones evaluadas (figura 18).

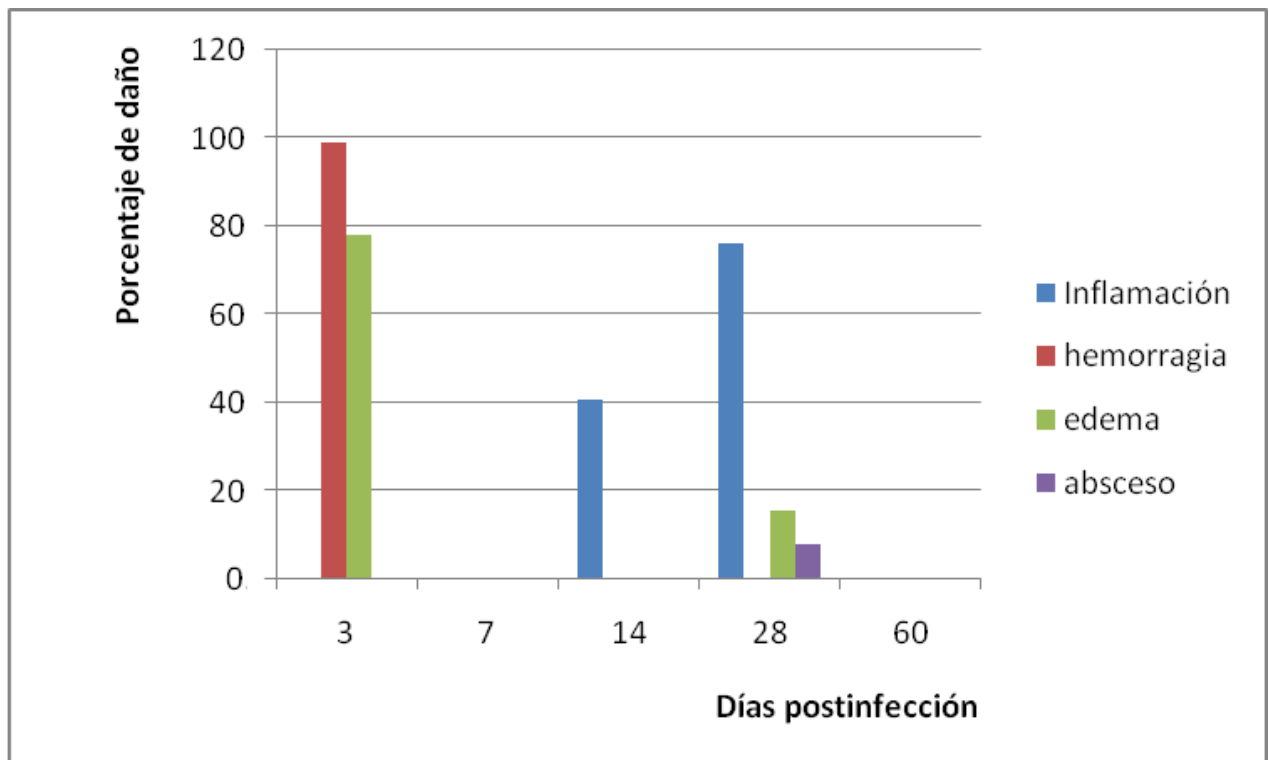


Figura 18.- Morfometría de pulmón. Inóculo de 30 artroconidios. Los datos se muestran en porcentajes, como se puede observar, las lesiones histopatológicas se presentan de manera heterogénea..

### 7.3.1.2 Cultivo y cuenta de unidades formadoras de colonias.

La infección pulmonar se comprobó por medio del cultivo micológico y se construyó la cinética microbiológica que se presenta en la figura 19. Las cuentas fueron de 0.33 y 0.15 UFC por pulmón en los días 7 y 28 respectivamente (esto es al menos una colonia en uno de los especímenes). En los demás días, el hongo no fue detectado.

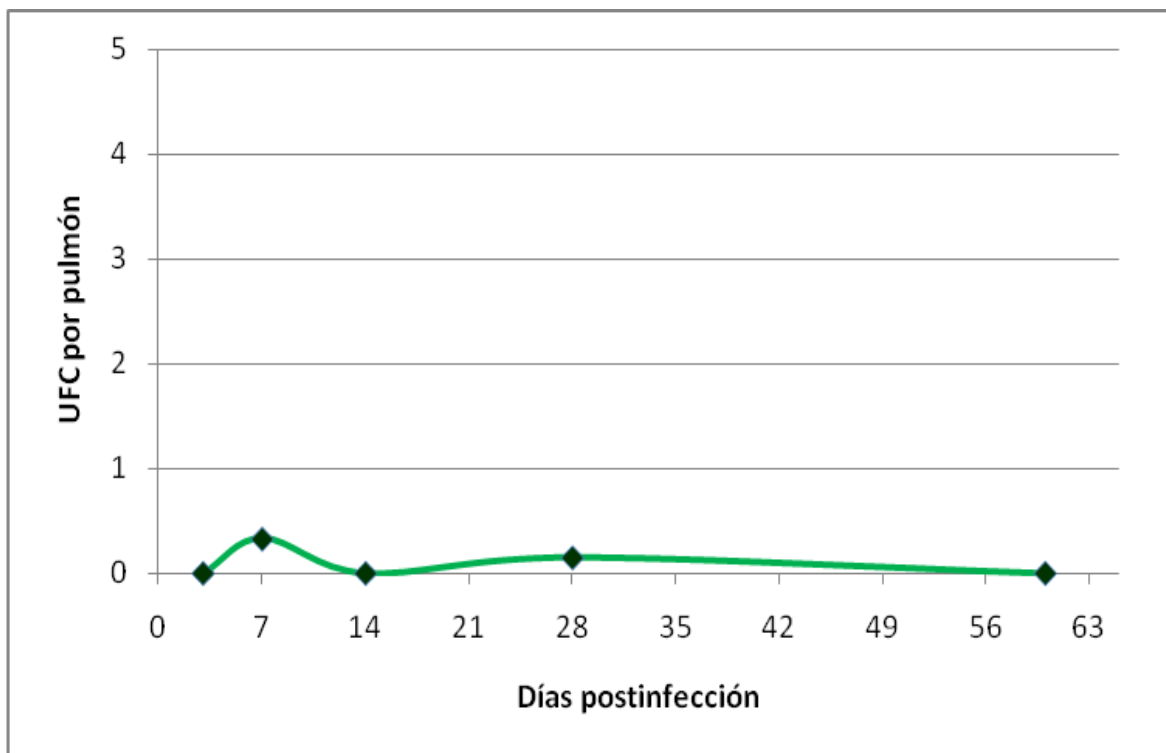


Figura.19.- Cuenta de unidades formadoras de colonias en pulmón con el inóculo de 30 artroconidios. Los resultados se muestran en UFC por pulmón.



### 7.3.1.3 Microscopía electrónica de formas parasitarias en pulmón.

Para realizar la microscopía electrónica de transmisión, fueron tomadas muestras del bloque de pulmón del día 28 con inóculo de 30 artroconidios (flechas de la figura 17d). Las micrografías se muestran en la figura 20. Cabe mencionar que no es posible observar los organelos de las endosporas, probablemente debido a defectos en la fijación de las muestras; sin embargo, es posible observar que la pared celular de las endosporas es muy gruesa y electrón-densa. No se observa la membrana celular. En las esférulas, se observa también una pared celular gruesa, misma que se puede observar inclusive a 400 aumentos en la figura 17d.

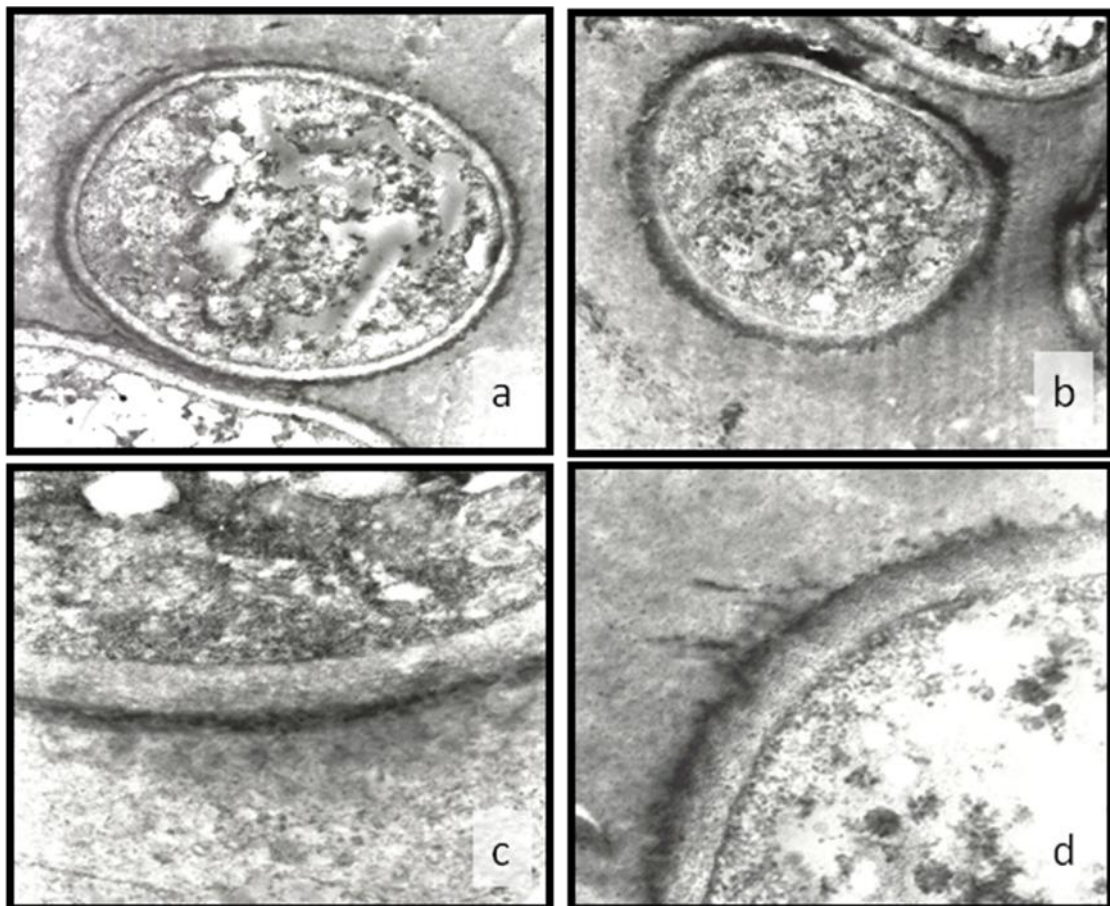


Figura 20.- Micrografías de formas parasitarias de *C. posadasii* en pulmón. a y b) endosporas 10000x y 12500x respectivamente. c y d) pared celular de esférulas inmaduras 25000x.

### 7.3.2 Hígado.

Durante el análisis histopatológico, se observaron inflamación a expensas de células mononucleares y microabscesos en el día 3 del experimento, el día 7 y 14 se observó congestión vascular. En el día 28 se observaron solamente microabscesos y en el día 60 se observó que el tejido no presentaba lesiones (figura 21).

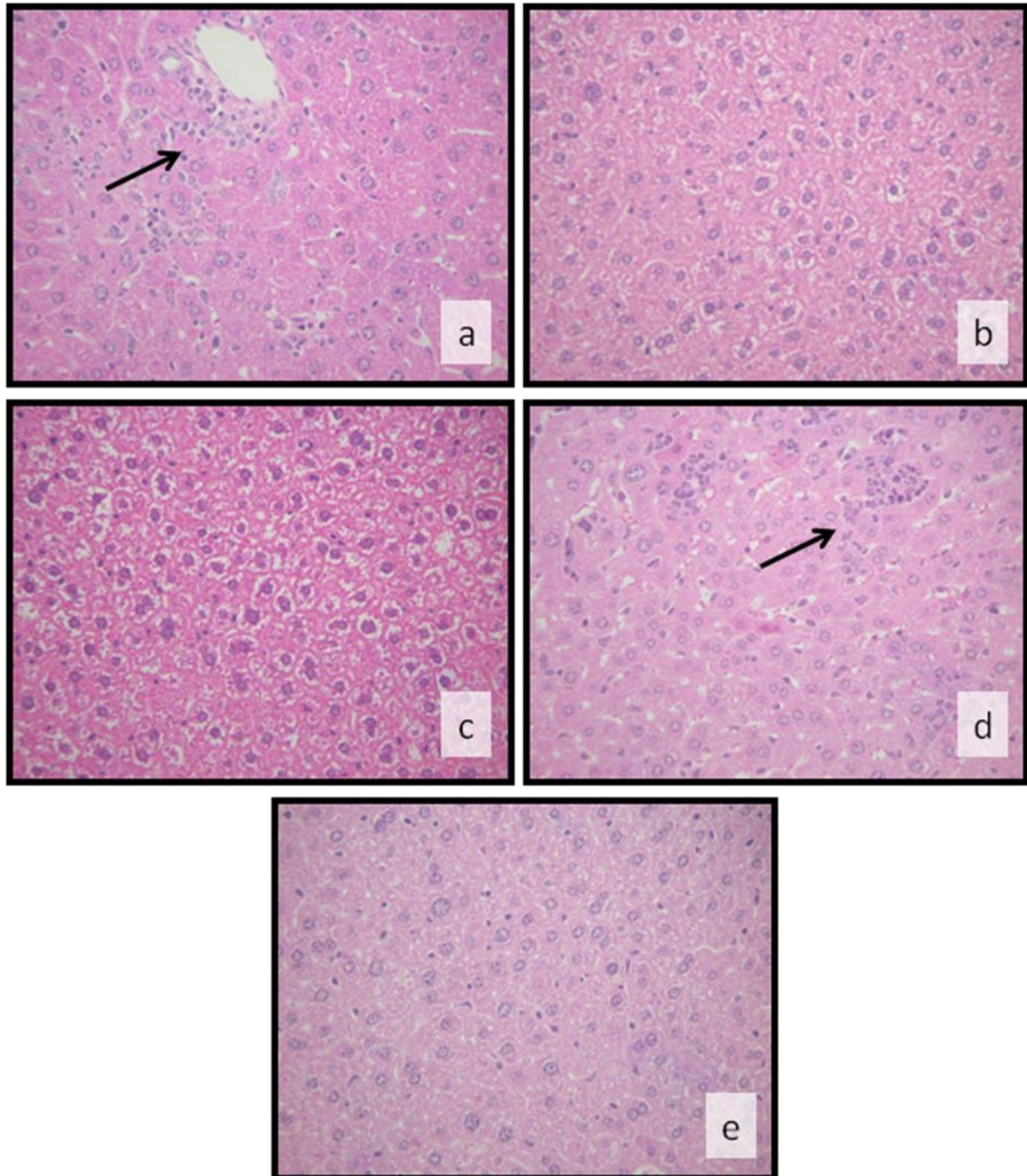


Figura 21.- Hallazgos histopatológicos en hígado con el inóculo de 30 artroconidios. a) Día 3, inflamación por mononucleares y microabscesos; b y c) Días 7 y 14, tejido sin lesión; d) Día 28, inflamación y microabscesos; e) Día 60, tejido sin lesión. (H&E x400).



### 7.3.3 Bazo.

Con el inóculo de 30 artroconidios de *C. posadasii*, se observa la progresión de la hiperplasia de la pulpa roja y folículos linfoides con centro germinal desde el día 3 del experimento (figura 22).

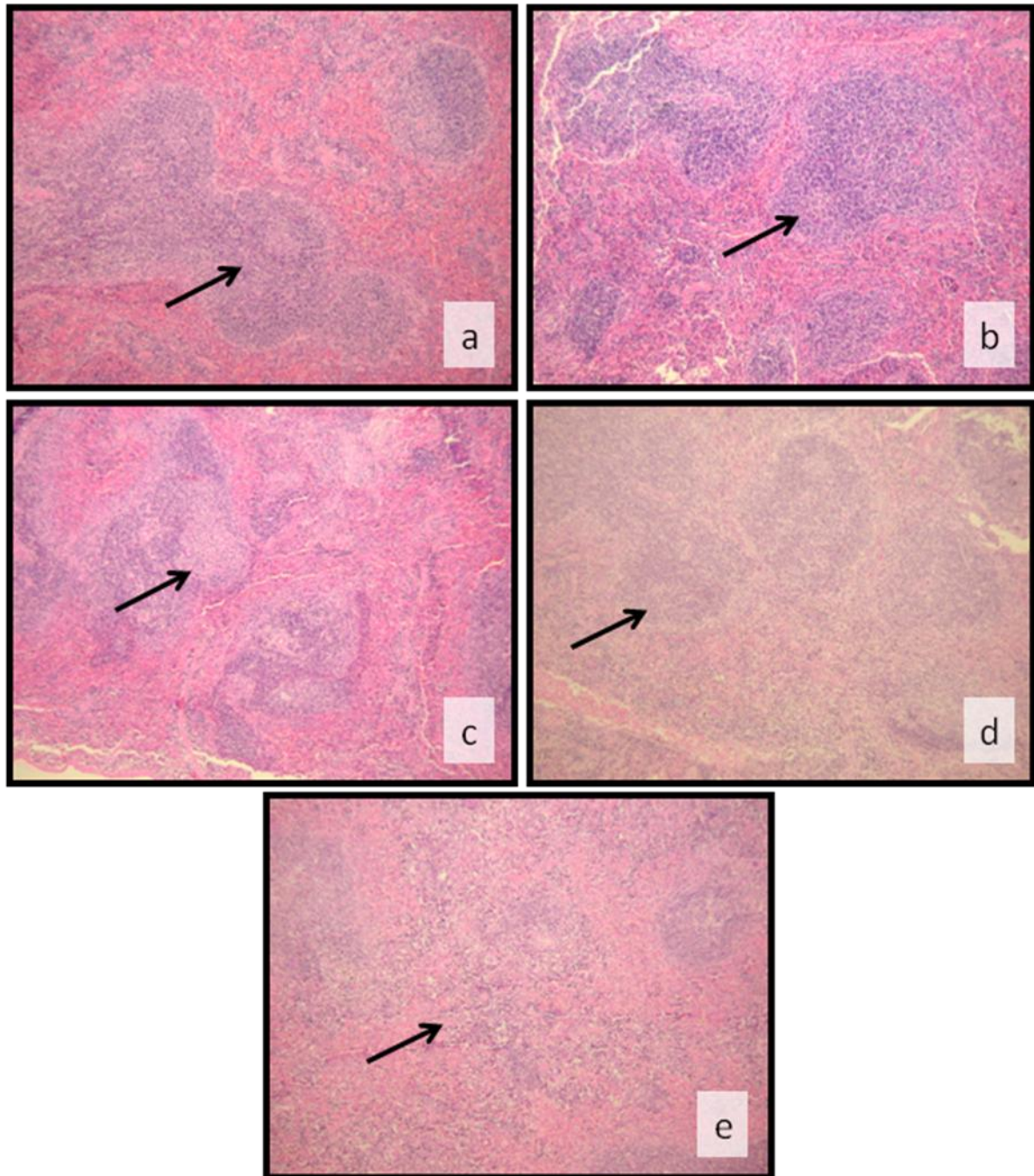


Figura 22.- Hallazgos histopatológicos en bazo con el inóculo de 30 artroconidios. a-e) Día 3, 7, 14, 28 y 60 respectivamente, hiperplasia ascendente de centros germinales y folículos linfoides con centros germinales. (H&E x100).

### 7.3.4 Corazón y riñones.

El tejido cardíaco mostró únicamente congestión a lo largo del experimento. Los riñones mostraron inflamación de la pelvis renal durante el desarrollo del trabajo.

### 7.3.5 Tubo digestivo y cerebro.

El estómago, intestino delgado e intestino grueso, no mostraron daño alguno. El tejido cerebral tampoco mostró signos de lesión durante el desarrollo del experimento (figura 23).

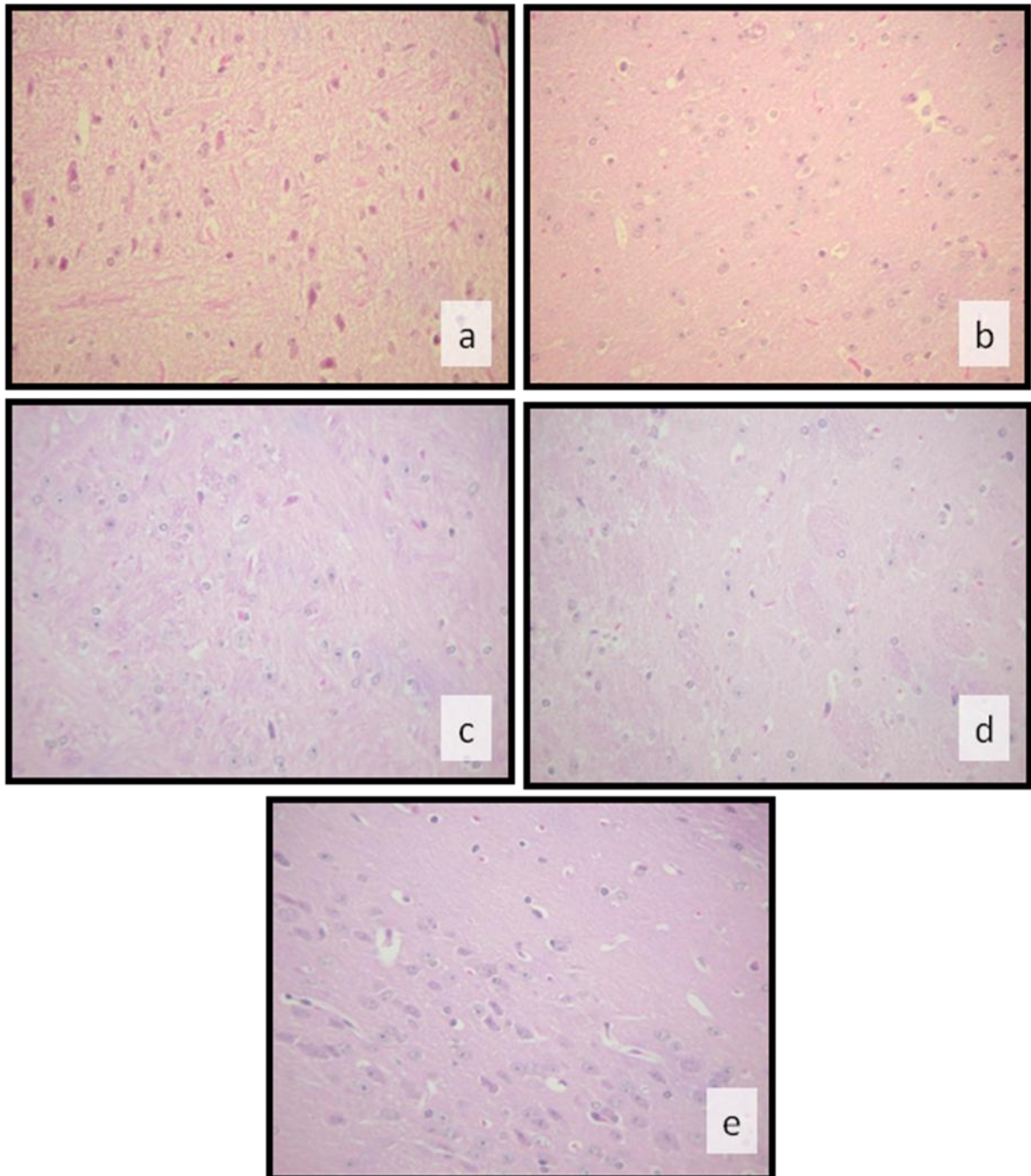


Figura 23.- Hallazgos histopatológicos en cerebro con el inóculo de 30 arthroconidios. a-e) Días 3, 7, 14, 28 y 60 respectivamente, tejido normal. (H&E x400).

#### 7.4 Supervivencia de los animales de experimentación.

Durante el desarrollo del trabajo, se contaron el número de animales que murieron antes de ser sacrificados para construir la curva de supervivencia. El número de muertes con el inóculo de 120 artroconidios fue de 2 de 15 animales (13.33%) entre el día 28 y 60. El número de muertes con el inóculo de 60 artroconidios fue de 1 de 15 animales entre el día 14 y 28, y 1 de 15 animales entre el día 28 y 60 (Total 13.33%).

Para el inóculo de 30 artroconidios, no hubo muertes (figura 24).

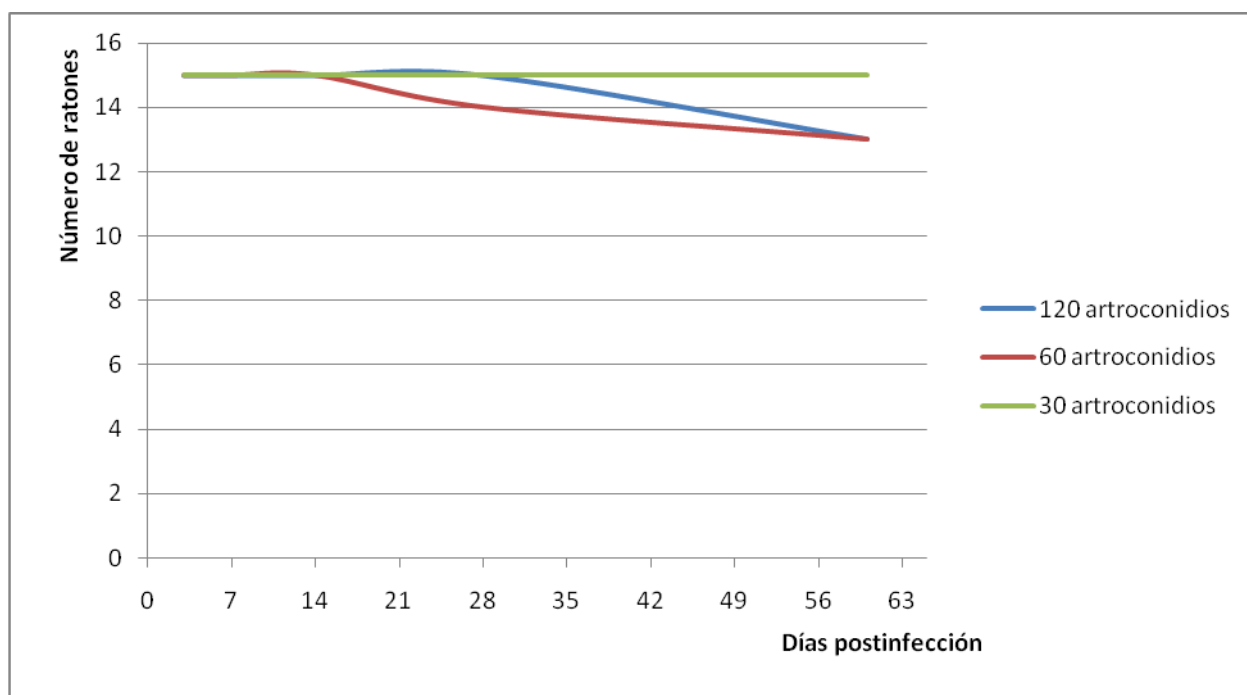


Figura 24.- Supervivencia de los animales de experimentación. Los resultados se muestran en número de ratones por día postinfección. Azul, inóculo de 120 artroconidios. Rojo, inóculo de 60 artroconidios. Verde, inóculo de 30 artroconidios. El total de muertes fue de dos para el inóculo de 120 artroconidios; dos para el inóculo de 60 artroconidios; ninguno para el inóculo de 30 artroconidios.

## 8. DISCUSIÓN.

Como anteriormente se había mencionado, la coccidioidomicosis es la micosis endémica de origen respiratorio más frecuente y grave. Es ocasionada por los hongos dimórficos *Coccidioides immitis* y *C. posadasii*. Ésta enfermedad se encuentra confinada únicamente al continente americano y los reportes en otros países se deben a personas que visitaron las zonas endémicas americanas.<sup>1,4</sup>

Se sabe que una de las áreas endémicas de mayor importancia es la zona sur de E.U.A que se extiende al norte de México. Se ha calculado que cada año, ocurren más de 100,000 infecciones de coccidioidomicosis en Estados Unidos y en años recientes, la incidencia se ha incrementado.<sup>22</sup> <sup>23</sup> En México, se desconoce las cifras epidemiológicas de esta enfermedad, en su mayoría debido a la falta de una norma que exija el reporte inmediato de casos diagnosticados, inclusive, se cuenta con pocos trabajos comunitarios que apoyen el estudio de esta enfermedad; Sin embargo, se sabe que el agente etiológico de la coccidioidomicosis más comúnmente aislado es *Coccidioides posadasii*.<sup>4,51</sup>

La coccidioidomicosis tiene varias presentaciones clínicas, la más frecuente es la pulmonar en la cual el 60% de las personas que la padecen son asintomáticas, y el 40% restante pueden referir fatiga, tos, dolor de pecho, disnea y, ocasionalmente, hemoptisis.<sup>10, 52</sup> Debido a que los síntomas son poco específicos, suele ser confundida con otras enfermedades, entre ellas la tuberculosis, pues además de compartir síntomas respiratorios, comparten las áreas endémicas.<sup>53</sup> Debido a esto, la enfermedad fúngica es comúnmente subdiagnosticada<sup>54</sup> y por lo tanto mal tratada. En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, se han encontrado casos (no reportados) en los que pacientes con síntomas respiratorios, son diagnosticados con tuberculosis y a pesar de recibir tratamiento (para tuberculosis) producen signos meníngeos y mueren en poco tiempo. En estas personas, después de la autopsia, se reveló que la verdadera enfermedad que padecían era coccidioidomicosis. Generalmente, la enfermedad debería autolimitarse, pero en algunos casos, y sobre todo posiblemente con la presencia de factores de riesgo o en este caso probablemente debido a la administración de corticoesteroides, puede diseminarse al organismo causando la muerte del individuo.<sup>11-13</sup>

Las formas más graves de la enfermedad, son aquellas extrapulmonares como la meningitis<sup>24</sup> y se reconoce que aspectos como la patogénesis, respuesta del huésped, inmunidad humoral y celular,

virulencia entre cepas, mecanismo de patogenicidad y otros, aun no han sido bien estudiados por la falta de un modelo adecuado.<sup>55</sup> En la actualidad, el modelo experimental ofrece una alternativa para el estudio de la respuesta del hospedero, la patogenia, la efectividad de vacunas y antifúngicos. Un modelo que logre reproducir el daño que experimentan los humanos durante la infección con *Coccidioides* sp., es un punto de partida para estudiar los aspectos antes mencionados con el fin de hacer frente a esta enfermedad.

En la literatura se encuentran algunos modelos que son capaces de desarrollar la enfermedad sistémica diseminada, la extrapulmonar y la meníngea, en estos la inoculación es intravenosa, intraperitoneal, intratecal e intracraneal respectivamente.<sup>50, 55, 56</sup> Sin embargo este tipo de inoculación es invasiva (no natural) y por si sola genera un daño.<sup>57</sup> La técnica de inoculación propuesta en este trabajo, es la vía natural, es decir, la inhalación de artroconidios por inoculación intranasal.<sup>1, 15, 19, 24</sup>

Poco se sabe sobre la dosis infectiva en humanos, pero en estudios previos se ha reportado que 10 artroconidios por vía intranasal, son suficientes para producir la enfermedad pulmonar en ratones. Autores como Magee y Cox han empleado dosis de 25 a 35 artroconidios de *C. posadasii* para documentar las diferencias en la virulencia de diferentes cepas en ratones BALB/c (datos no publicados).<sup>58</sup> Para producir la enfermedad sistémica, esta reportado que la cantidad necesaria es de 50 artroconidios de *C. immitis* por vía intravenosa (una vía no natural que por si misma genera un daño) y 50 artroconidios de *C. posadasii* cepa Silveria por vía intranasal en ratones hembra C57BL/6, DBA/2n, y Swiss-Webster; para ratones macho Beige y Nude se reportan hasta 200 artroconidios por vía intranasal.<sup>50, 59</sup> Estos dos últimos estudios tienen la desventaja de manejar ratones hembras con variaciones hormonales y ratones no singénicos susceptibles con variaciones genéticas respectivamente. Un mejor modelo debería eliminar estas dos variantes.

Se ha reportado que los ratones BALB/c son susceptibles a la coccidioidomicosis y sobre todo los machos son más propensos debido a la producción de testosterona;<sup>60, 61</sup> sin embargo, sus características hacen que sean propuestos como huéspedes modelo, pues debido a que pertenecen a cepas singénicas de reproducción consanguínea (inbred), se disminuyen al mínimo las variaciones genéticas entre los animales empleados y por lo tanto las diferencias entre su respuesta al reto impuesto. A pesar de que el ratón macho es más susceptible a la enfermedad, de esta forma se controla la variación hormonal pues se eliminan los ciclos estrogénicos que tienen lugar en las hembras, lo que disminuye la variación en la respuesta inmune. También se ha

reportado que no hay diferencias cualitativas entre la histopatología de ratones con reproducción consanguínea resistentes y susceptibles,<sup>60</sup> por lo cual es indiferente utilizarlos; no obstante, por razones de bioseguridad, es más conveniente emplear ratones susceptibles para manejar dosis bajas de artroconidios.

Por todo lo anteriormente descrito, en el presente trabajo, se probaron las dosis de 30, 60 y 120 artroconidios para infectar ratones macho BALB/c. La cepa fúngica elegida es un aislamiento clínico mexicano de *Coccidioides posadasii* donada por la Universidad Autónoma de Nuevo León con morfología típica al que denominamos 90UANL, esta cepa fue identificada por métodos de biología molecular.<sup>62</sup>

Todos los grupos de ratones inoculados con las diferentes dosis de artroconidios mostraron una infección pulmonar y lesiones extrapulmonares; sin embargo, las formas parasitarias solo fueron observadas en pulmón e hígado. La respuesta inflamatoria temprana fue a expensas de células mononucleares principalmente, lo cual contrasta con publicaciones previas, en las cuales los neutrófilos fueron las células que predominaron.<sup>59</sup> En el caso de los grupos de ratones inoculados con 120 y 60 artroconidios, se observó la presencia células epitelioides binucleadas en pulmón después del día catorce, signo de inflamación crónica, lo cual refiere que el sistema inmune necesita de otra estrategia para deshacerse de la infección, pues los macrófagos no son suficientes. Este tipo de inflamación está referida en el caso de coccidioidomicosis pulmonar.<sup>63</sup> En humanos, los pulmones presentan una reacción granulomatosa alrededor de las formas parasitarias (esférulas) y se caracteriza por la presencia de histiocitos y células gigantes tipo cuerpo extraño con linfocitos, células plasmáticas, monocitos, células epitelioides y después fibrosis, caseificación y calcificación.<sup>17</sup> El modelo desarrollado, muestra precisamente este patrón, aunque no se logró observar calcificación.

Aunado a esto, los datos muestran que los signos en bazo son progresivos, la hiperplasia de pulpa blanca, la presencia de centros germinales y la esplenomegalia están relacionadas con las infecciones activas que tienden a la producción de linfocitos B con producción células plasmáticas y anticuerpos.

El grupo de ratones inoculados con 120 artroconidios, además mostró lesiones poco comunes como la congestión cardíaca y la pericarditis, esta última se ha reportado en pacientes mexicanos;<sup>32</sup> por otro lado, entre las especificaciones de la cepa de ratón empleada, se tiene que



los ratones BALB/c muestran alta incidencia en defectos cardiacos y calcificación cardiaca.<sup>64</sup> Otro hallazgo, fue el de inflamación de pelvis renal a lo largo del experimento, esto podría ser signo de infección, la cual se encuentra reportada como infección genitourinaria en la literatura.<sup>65</sup>

Algo que llama la atención, es que en ninguna de las dosis probadas, se observaron lesiones o infección en el cerebro. Algo que podría explicar esto es que la barrera hematoencefálica está intacta y no permite que ocurra la diseminación a este tejido. Otra hipótesis es que aunque el estímulo (patógeno) se encuentra presente, el tiempo máximo de sacrificio (60 días) es poco para observar la infección del cerebro. Por último queda que probablemente el patógeno no tenga tropismo a cerebro y realmente lo está evadiendo.

En cuanto a la cronicidad de la enfermedad desarrollada en los animales, el modelo con 120 artroconidios mostró que era menor en comparación con el de 60 artroconidios. En los tres modelos, las lesiones coinciden con las cuentas más altas de UFC, esto da evidencia de que la respuesta del hospedero, está en función del inóculo y de la carga micológica en el órgano. Probablemente el modelo con 120 artroconidios, podría ser empleado cuando se necesita analizar la respuesta a una enfermedad aguda, mientras que el de 60 artroconidios podría emplearse para estudiar la respuesta a una enfermedad crónica.

En el caso del modelo con inoculación de 30 artroconidios, probablemente el sistema inmune de los animales de experimentación está logrando contener la infección desde el principio del experimento, pues las cuentas micológicas no llegan ni a dos UFC por pulmón en ninguno de los animales. Los cambios histopatológicos son heterogéneos y no se observó esplenomegalia, pero si hay progresión de la hiperplasia de la pulpa blanca y presencia de centros germinales en los folículos linfoides del bazo, esto hace suponer que 30 artroconidios son suficientes para estimular al bazo para la producción de linfocitos B y que se trata de una infección activa.

En ningún modelo, se observaron formas filamentosas o diferentes a las endosporas o esférulas en diferentes estadios de maduración. Los reportes realizados por investigadores mexicanos indican que se han observado en cavitaciones y en productos biológicos de pacientes con algún factor de inmunosupresión.<sup>9,41</sup>

En cuanto a la microscopía electrónica de transmisión, no es posible ver los organelos ni la compartimentación del citoplasma en los diferentes estadios de las formas parasitarias que ha sido

previamente descrita,<sup>66</sup> probablemente debido a una mala técnica de fijación, pues el tejido fue extraído de bloques de parafina con una metodología que sigue ciclos de calor y exposición a solventes, mismos que podrían dañarlo al punto de borrar los detalles de su ultraestructura.

Durante el experimento, solo hubo dos pérdidas de animales (13.33%) en el modelo con el inóculo de 120 artroconidios antes del día 60. En el modelo con 60 artroconidios también hubo dos muertes, una antes del día 28 y otra entre el día 28 y 60 (13.33%). Esto llama la atención, pues en otros modelos como el de Magee y Cox, la mayoría de los animales (>50% ratones BALB/c) murieron al día 14 después de ser inoculados por vía intratraqueal e intranasal con dosis de 19 a 35 artroconidios de diversos aislamientos de *C. posadasii* (datos no publicados),<sup>58</sup> esto nos lleva a pensar en diferencias en la virulencia entre los aislamientos de *C. posadasii*.

Recapitulando, el modelo propuesto para la coccidioidomicosis sistémica, posee las ventajas de manejar una cepa mexicana de *C. posadasii* y ratones macho BALB/c, que son susceptibles y que desarrollan la enfermedad sistémica con dosis bajas de artroconidios (120, 60 y 30 artroconidios). Debido al género y la composición genética de la cepa de ratón empleada, las variaciones en la respuesta entre cada individuo, es reducida al mínimo. La enfermedad desarrollada con 120 y 60 artroconidios es sistémica y muestra signos de inflamación crónica a los días 14 y 28 después de la infección respectivamente, con una duración aguda y crónica también respectivamente. La sobrevivencia en el modelo con ambos inóculos es alta.

Cabe mencionar que es importante reproducir el experimento en hembras de la cepa BALB/c, pues de esta manera se podrían comparar los resultados y observar si las diferencias son significativas. En experimentos futuros, el tiempo del experimento se podría prolongar para observar si efectivamente el patógeno es eliminado o si existe latencia y reactivación de la misma. También como perspectiva, sería posible inducir un estado de inmunosupresión o de enfermedad diabética, lo cual aportaría información valiosa. Consideramos que además sería atractivo realizar pruebas inmunohistoquímicas para la obtención del patrón de interleucinas de los modelos, así como la caracterización bioquímica.

Reiteramos que el modelo murino propuesto, es uno de los primeros pasos en el estudio de la coccidioidomicosis sistémica y es importante que se le dé seguimiento, pues de esto depende la mejor atención y tratamiento a las personas que padecen o pueden llegar a padecer esta enfermedad.

## **9. CONCLUSIONES.**

- Los grupos de ratones macho BALB/c inoculados con 120 y 60 artroconidios muestran una enfermedad sistémica con inflamación crónica y baja mortalidad.
- El grupo de ratones inoculados con 120 artroconidios puede reproducir las lesiones reportadas en humanos.
- Los grupos de ratones inoculados con 120 y 60 artroconidios podrían emplearse para emular la enfermedad sistémica aguda y crónica respectivamente.
- El grupo de ratones inoculados con 30 artroconidios muestra una respuesta heterogénea en los animales de experimentación.

## **10. PERSPECTIVAS.**

- Aumentar el número de ratones en el estudio.
- Obtención del perfil de interleucinas en el modelo desarrollado.
- Caracterización bioquímica del modelo.
- Desarrollar del modelo en ratones inmunosuprimidos y/o con diabetes.

## 11. PRODUCTOS.

- Diploma. Durante el periodo del 09 de Junio al 04 de Julio del 2008 se curso el **VII Diplomado Teórico Práctico en Micología Médica “Dr. Amado González Mendoza”** organizado por el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM, con una duración de 200 horas de las cuales 128.5 fueron horas teóricas y 71.5 fueron horas prácticas. Fue aprobado obteniendo un Diploma con valor de 20 créditos.
- Constancia. Participación como **COORDINADORA** del curso monográfico **“Introducción a la Patología Infecciosa y Tropical”** en el marco del Verano de la Investigación Científica 2008, de la Academia Mexicana de Ciencias y el programa Delfín. Del 3 de Julio al 4 de Agosto de 2008, en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez”. México D.F.
- Constancia. Participación como **PONENTE** del curso monográfico **“Introducción a la Patología Infecciosa y Tropical”** en el marco del Verano de la Investigación Científica 2008, de la Academia Mexicana de Ciencias y el programa Delfín. Del 3 de Julio al 4 de Agosto de 2008 en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez”. México D.F.
- Constancia. Participación como **PONENTE** en la modalidad de cartel del trabajo titulado **“Predicción de la estructura secundaria y terciaria de la ureasa de *Coccidioides posadasii* por homología con la ureasa de *Bacillus pasteurii*”** (81472), en las VII Jornadas de Biomedicina y Biotecnología Molecular “Dr. Guillermo Carvajal Sandoval” del 24 al 27 de Marzo de 2009, en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, México D.F.
- Constancia. Participación como **COORDINADORA** del curso monográfico **“La investigación en medicina”** en el marco del Verano de la Investigación Científica 2009, de la Academia Mexicana de Ciencias y el programa Delfín. Del 6 de Julio al 14 de Agosto de 2009, en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez”. México D.F.
- Constancia. Participación como **PONENTE** del curso monográfico **“La investigación en medicina”** en el marco del Verano de la Investigación Científica 2009, de la Academia Mexicana de Ciencias y el programa Delfín. Del 6 de Julio al 14 de Agosto de 2009, en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez”. México D.F.

## 12. REFERENCIAS.

1. Fisher MC, Koenig GL, White TJ and Taylor JW. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia*. 2002; 94:73-84.
2. Bowman HB, White JT, and Taylor WJ. Human pathogenic fungi and their close nonpathogenic relatives. *Molecular Phylogenetics Evolution*. 1996; 6:89-96.
3. Fisher MC, Koenig GL, White TJ, San-Blas G, Negroni R, Gutiérrez-Alvarez I, Wanke B and Taylor JW. Biogeographic range expansion into South America by *Coccidioides immitis* mirrors New World patterns of human migration. *Proceedings of the National Academy of Science*. 2001; 98(8): 4558-4562.
4. Castañón OLR, Aroch CA, Bazán ME y Córdova ME. Coccidioidomycosis y su escaso conocimiento en nuestro país. *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM*. 2004; (47)4:145-148.
5. Stevens AD. Coccidioidomycosis. *The New England Journal of Medicine*. 1995; 332(16): 1077-1082.
6. Huppert M and Sun SH. 1980. Mycological diagnosis of coccidioidomycosis, p. 47-61. In D. A. Stevens (ed.), *Coccidioidomycosis: A Text*. Plenum Medical Book Company, New York, NY.; Ampel, N. M., C. L. Dols, & J. N.
7. Ampel MN, Dols LC, and Galgiani NJ. Coccidioidomycosis during human immunodeficiency virus infection: results of a prospective study in a coccidioidal endemic area. *The American Journal of Medicine*. 1993; 94(3): 235-240.
8. Arenas R. 2005. Coccidioidomycosis, p 155-162, En R Arenas. *Micología Médica ilustrada*. (2ª edición). Mc Graw Hill.
9. Muñoz-Hernández B, Martínez-Rivera MA, Palma Cortés G, Tapia-Díaz A and Manjarrez Zavala ME. Mycelial forms of *Coccidioides* spp. in the parasitic phase associated to pulmonary coccidioidomycosis with type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2008; 27(9):813–820.
10. Saubolle AM, McKellar PP and Sussland D. Epidemiologic, clinical, and diagnostic aspects of coccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007; 45: 26-30.
11. Kirkland TN and Fierer J. Coccidioidomycosis: a reemerging infectious disease. *Emerging infectious diseases* 1996; 2(3):192-199.
12. Kleinschmidt-DeMasters BK and Mazowiecki M. Coccidioidomycosis meningitis with massive dural and cerebral venous thrombosis and tissue arthroconidia. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2000; 124(2):310-314.

13. Kolivras KN and Comrie AC. Modeling valley fever (coccidioidomycosis) incident on the basis of climate conditions. *International Journal of Biometeorology*. 2003; 47(2):87-101.
14. Castañeda GR y Laniado LR. Coexistencia de tuberculosis y coccidioidomycosis. Presentación de dos casos clínicos. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 2002; 15(2): 98-101.
15. Hurtado-Montalvo JA, Cerecer-Callu P y Esquer-Zamorano RA. Diagnóstico diferencial de coccidioidomycosis y tuberculosis en el niño. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 1999; 19(4): 181-186.
16. Perea S and Patterson TF. Endemic Mycoses. In: EJ Anaissie, McGinnis MR, Pfaller MA. *Clinical Mycology*. Philadelphia: Elsevier Science 2003. 352-369.
17. Pappagianis D. *Coccidioides immitis*. In: Ajello L, Hay RJ. *Microbiology and microbial infections vol 4*. 9th Edic. Nueva York: Oxford University Press 2001: 357-72.
18. Ayala-Gaytán JJ, Condarco-Cortés BA, Pérez-Zuno JA y Moreno- Guevara P. El fluconazol en la coccidioidomycosis meníngea. *Revista de Investigación Clínica*. 1997; 49(3): 205-208.
19. Aguilar JA, Summerson C, Granada MC, Jiménez C y De la Torre S. Pericarditis por coccidioidomycosis. Informe de un caso. *Archivos de Cardiología de México*. 2001; 71: 313-318.
20. Smith CE, Beard RR, Rosenberger HG and Whiting EG. Effect of season and dust control on coccidioidomycosis. *Journal of American Medical Association*. 1946; 132(14): 833-838.
21. Pappagianis D. Epidemiology of Coccidioidomycosis. *Current Topics in Medical Mycology*. 1988; 2:199-238.
22. Galgiani JN. Coccidioidomycosis: A regional disease of national importance. Rethinking our approaches to its control. *Annals of Internal Medicine*. 1999; 130: 293-300.
23. Ampel NM, Mosely DG, England B, Vertz PD and Komatsu K. Coccidioidomycosis in Arizona: Increase in incidence from 1990 to 1995. *Clinical Infectious Disease*. 1998; 27: 1528-1530.
24. Pappagianis D. 1980. Epidemiology of Coccidioidomycosis, p. 63- 86. In Stevens DA (ed.), *Coccidioidomycosis*. Plenum Medical Book Co, New York, NY.
25. Calderón GAL, Piña OK, Leal MAM y López CA. Mortalidad por coccidioidomycosis: estudios de casos de autopsia en un hospital de referencia en Nuevo León. *RESPYN, Edición Especial No.1 – 2003*.
26. Chaturvedi V, Ramani R, Gromadzki S, Rodeghier B, Chang HG and Morse DL. Coccidioidomycosis in New York State. *Emerging Infectious Disease*. 2000; 6: 25-29.
27. Stewart EA and Meyer KF. Isolation of *Coccidioides immitis* (Stiles) from the soil. *Proc. Society Experimental Biology and Medicine*. 1932; 29: 937-938.

28. Maddy K. 1957. Ecological factors possible relating to the geographic distribution of *Coccidioides immitis*. In Proceedings of the Symposium on Coccidioidomycosis. U.S. Public Health Serv Public N° 575, pp 144-157.
29. Negroni P. 1966. Las Blastomycosis y Coccidioidomycosis, p. 133-145; 234-257. In Comisión de Investigación Científica Micosis Profundas. Gobernación, Argentina., Provincia de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
30. Espinal LS and Montenegro E. 1963. Formaciones vegetales de Colombia. Memoria explicativa sobre el mapa ecológico. Inst Geogr Agustín Codazzi, Bogotá D.C.
31. Purtillo DT, Walsh GP, Storrs EE and Gannon C. The immune system of the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*). Anatomical Record. 1975; 181: 725-734.
32. González OA. 1967. Coccidioidomycosis in Mexico, p. 293- 301. In L. Ajello (ed.), The second symposium on coccidioidomycosis. The University of Arizona Press, Tucson, AR.
33. Padua-Gabriel A, Martínez-Ordaz VA, Velasco- Rodríguez VM, Lazo-Saenz JG and Cicero R. Prevalence of skin reactivity to coccidioidin and associated risk factors in subjects living in a northern city of Mexico. Archives of Medical Research. 1999; 30: 388-392.
34. Negroni P. 1967. Coccidioidomycosis in Argentina, p. 273-278. In L. Ajello (ed.), The second symposium on coccidioidomycosis. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona.
35. Eulálio KD, Macedo RL and Cavalcanti MA. *Coccidioides immitis* isolated from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the state of Piauí, northeast Brazil. Mycopathologia. 2001; 149: 57- 61.
36. Sidrim JJC, Silva LCI, N. JMA, Rocha MFG and Paixao GC. Le Nor-Este brésilien, région d'endémie de coccidioidomycose? A propos d'une micro-épidémie. Journal de Mycologie Médicale. 1997; 7: 37-39.
37. Wanke B, Lazera M, Monteiro PC, Lima FC, Leal MJ, Ferreira-Filho PL, Kaufman L, Pinner RW and Ajello L. Investigation of an outbreak of endemic coccidioidomycosis in Brazil's northeastern state of Piauí with review of the occurrence and distribution of *Coccidioides immitis* in three other Brazilian states. Mycopathologia. 1999; 148: 57 67.
38. Robledo M, Restrepo A, Restrepo M, Ospina S y Gutiérrez F. Encuesta epidemiológica sobre Coccidioidomycosis en algunas zonas áridas de Colombia. Antioquia Méd. 1968; 18:505-522.
39. Vélez A, Robledo M, Tobón AM, Gómez CI, Upegui JJ, Hincapié MI, Moncada LE, Arango M y Restrepo A. Coccidioidomycosis pulmonar. Informe de un caso autóctono. Medicina UPB. 1997; 16:97-108.
40. Galgiani NJ, Ampel MN, Catanzaro A, Johnson RH, Stevens DA and Williams PL. Practice guideline for the treatment of coccidioidomycosis. Infectious Diseases Society of America. Clinical Infectious Disease. 2000; 30(4): 658-661.

41. Muñoz HB, Castañón LR, Calderón I, Vázquez ME and Manjarrez ME. Parasitic mycelial forms of *Coccidioides* species in mexican patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42(3): 1247-1249.
42. Toriello C, Reyes-Montes R y Taylor ML. Producción de antígenos fúngicos autóctonos en el inmunodiagnóstico de micosis en México. *Revista de Investigación Clínica*. 1997; 49: 501-505
43. Park DW, Sohn JW, Cheong HJ, Kim WJ, Kim MJ, Kim JH and Shin C. Combination therapy of disseminated coccidioidomycosis with caspofungin and fluconazole. *BMC Infectious Diseases*. 2006.; 15:6-26.
44. González GM, Tijerina R, Najvar KL, Bocanegra R, Rinaldi GM and Graybill JR. Efficacies of amphotericin B (AMB) Lipid complex, AMB colloidal dispersion, liposomal AMB, and conventional AMB in treatment of murine coccidioidomycosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; 48(6): 2140-2143.
45. Proia AL and Tenorio RA. Successful use of voriconazole for treatment of coccidioides meningitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004. 48(6): 2341.
46. Cortez KJ, Walsh TJ and Bennett JE. Successful treatment of coccidioidal meningitis with voriconazole. *Clinical Infectious Disease*. 2003; 36: 1619-1622.
47. Deresinski SC. Coccidioidomycosis: efficacy of new agents and future prospects. *Current Opinion in Infectious Disease*. 2001; 14(6): 693-696.
48. Clemons VK, Capilla J and Stevens DA. Experimental animal models of coccidioidomycosis. *Annals of New York Academy of Science*. 2007; 1111:208-224.
49. Lawrence RM, Huston AC and Hoepfich PD. Reproducible method for induction of pulmonary coccidioidomycosis in mice. *Journal of Infectious Disease*. 1977; 13:117-119.
50. Clemons VK, Leathers RC, and Lee WK. Systemic *Coccidioides immitis* Infection in Nude and Beige Mice. *Infection and Immunity*. 1985; 47(3):814-821.
51. Viriyakosol S, Fierer J, Brown DG and Kirkland NT. Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on toll-like receptor 2 and Dectin-1. *Infection and Immunity*. 2005; 73(3): 1553-1560.
52. Laniado-Laborín R. Coccidioidomycosis and other endemic mycoses in Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2007; 24: 249-258.
53. Meyer PR, Hui AN, and Biddle M. *Coccidioides immitis* meningitis with arthroconidia in cerebrospinal fluid: report of the first case and review of the arthroconidia literature. *Human Pathology*. 1982; 13:1136–1138.
54. Nosanchuk JD, Snedeker J, and Nosanchuk JS. Arthroconidia in coccidioidoma: case report and literature review. *International Journal of Infectious Disease*. 1998; 3:32–35.



55. Kamberi P, Sobel AR, Clemons VK, Stevens AD, Pappagianis D, and Williams LP. A Murine Model of Coccidioidal Meningitis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2003; 187:453–460.
56. Fierer J, Walls L, Eckmann L, Yamamoto T and Kirkland NT. Importance of Interleukin-10 in Genetic Susceptibility of Mice to *Coccidioides immitis*. *Infection and Immunity*. 1998; 66(9): 4397–4402.
57. Hernández PR, Orozco EH, Aguilar LD, López CF and Rook G. Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental. *Mensaje Bioquímico*. 2004; 28:129-153.
58. Cox RA and Magee DM. Coccidioidomycosis: Host Response and Vaccine Development. *Clinical Microbiology Reviews*. 2004; 17(4): 804-839.
59. Shubitz FL, Dial MS, Perrill R, Casement R, and Galgiani NJ. Vaccine-Induced Cellular Immune Responses Differ from Innate Responses in Susceptible and Resistant Strains of Mice Infected with *Coccidioides posadasii*. *Infection and immunity*. 2008; 76(12): 5553-5564.
60. Kirkland NT and Fierer J. Inbred Mouse Strains Differ in Resistance to Lethal *Coccidioides immitis* Infection. *Infection and Immunity*. 1983; 40(3): 912-916.
61. Drutz JD, Huppert M, Sun HS and McGuire LW. Human Sex Hormones Stimulate the Growth and Maturation of *Coccidioides immitis*. *Infection and Immunity*. 1981; 32(2):897-907.
62. Castañon Olivares LR, Gereña-Elizalde D, González-Martínez MR, Licea Navarro AF, González-González GM and Aroch-Calderón A. Molecular identification of *Coccidioides* isolates from Mexican patients. *Annals of New York Academic of Science*. 2007; 1111:326-335.
63. Wiebe BM, Stenderup J, Grode GW and Jacobsen GK. Pulmonary coccidioidomycosis. *Ugeskrift of Laeger*. 1993. 331;155(22):1722-1723.
64. Ace Animals, Inc. & Media Fusion Technologies Inc. Copyright © 2006. Características del ratón BALB/c. <http://www.aceanimals.com/BalbC.htm> Consultado el 19 de diciembre de 2009.
65. Chiller MT, Galgiani NJ and Stevens AD. Coccidioidomycosis. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2003. 17; 41-57.
66. O'Hern EM and Henry BS. A cytological study of *Coccidioides immitis* by electron microscopy. *Journal of Bacteriology*. 1956. 72(5):632-45.