

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



“Diferencias en la virulencia de una cepa de *Coccidioides immitis* y su subcultivo tras 180 pasajes seriales”

Por

DR. ADALBERTO SANTANA GUTIÉRREZ

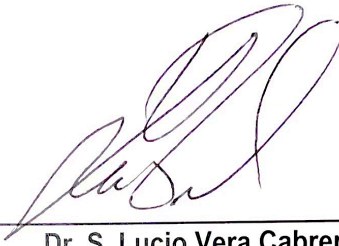
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN DERMATOLOGÍA**

DICIEMBRE, 2023

Aprobación de tesis:



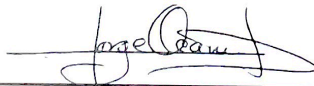
Dra. C. Carmen Amelia Molina Torres
Directora de tesis



Dr. S. Lucio Vera Cabrera
Co-Director de Tesis



Dra. med. Minerva Gómez Flores
Coordinadora de Enseñanza



Dr. med. Jorge de Jesús Ocampo Candiani
Jefe del Departamento de Dermatología y Co-Director de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

A mi familia que siempre me apoyó durante mi carrera profesional, y aún con los sacrificios de tiempo y ausencia en compromisos siguieron presentes cuando lo necesitaba. Especialmente a mi madre y mi padre que diariamente se interesaban por mi desempeño y estaban al pendiente de sol a sol.

A mis maestros del Departamento de Dermatología, a quienes llevaré siempre presentes; darme la oportunidad de estar en el mejor centro del país y compartir su conocimiento fue un muy generoso regalo del que siempre estaré agradecido, además de que su apoyo fue esencial para mi desarrollo personal y académico.

A mis amigos de laboratorio de Dermatología que me compartieron de su tiempo y sabiduría durante la tesis, gracias por estar disponibles ante cualquiera de mis inquietudes.

A mis amigos de residencia que se convirtieron en familia y que en conjunto resolvimos y encontramos respuestas para los problemas de los pacientes, me impulsaron a seguir aprendiendo y me dieron conocimiento que tal vez sólo no hubiera encontrado; se convirtieron en consejeros para cualquier situación que lo requiriera y su convivencia hizo muy alegre mi curso en la residencia médica.

Gracias a Dios por bendecirme con estas oportunidades, por hacer real mis metas académicas y personales a este tiempo, y guiarme para buscar el beneficio de los demás.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Página
1. RESUMEN	1
Capítulo II	
2. INTRODUCCIÓN	3
Capítulo III	
3. JUSTIFICACIÓN	16
Capítulo IV	
4. HIPÓTESIS	16
Capítulo V	
5. OBJETIVOS	17
Capítulo VI	
6. METODOLOGÍA.	18
Capítulo VII	
7. RESULTADOS	24
Capítulo VIII	
8. DISCUSIÓN	30

Capítulo IX	
8. CONCLUSIONES.....	36
Capítulo X	
9.BIBLIOGRAFÍA.....	37
Capítulo XI	
11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Cultivos de <i>C. immitis</i>	20
2. Visualización de esférulas con endosporas	25
3. Producción de esférulas en medio RPMI	26
4. Identificación de micelio con artronidias.....:.....	26
5. Cultivos en medio RPMI	27
6. Cultivo de rebanadas de pulmón de hámster infectadas.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

EUA: Estados Unidos de América

CDC: Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades

spp: Especie

HyE: Hematoxilina y eosina

PAS: Ácido peryódico de Schiff

PCR: reacción en cadena de polimerasa

C. immitis: *Coccidioides immitis*

C. posadasii: *Coccidioides posadasii*

TLR: Toll-like receptor

TNF: factor de necrosis tumoral

IL: interleucina

CTS: sintasa de quitina

BCG: bacilo de Calmette-Guérin

CO₂: dióxido de carbono

RPMI: medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

RPMI-sph: medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute suplementado con 10% suero bovino fetal

PCLS: precision-cut lung slices

KB: solución de Krebs-Henseleit

µm: micrometro

µl: microlitro

TYI: tirosina-Hierro-Extracto de levadura

PBS: phosphate buffered saline

P0: pase 0

P180: pase 180

CAPÍTULO I

RESUMEN

La coccidioidomicosis es una enfermedad fúngica causada por el hongo *Coccidioides*, endémico en regiones áridas del hemisferio occidental como la franja fronteriza de México con EUA. Se transmite principalmente por la inhalación de esporas presentes en el suelo. Las manifestaciones que van desde asintomáticas hasta potencialmente mortales. La virulencia se relaciona con la capacidad del patógeno para multiplicarse y dañar al hospedero, requiriendo invasión activa de los tejidos. La identificación de estos factores y organismos susceptibles guía la investigación para desarrollar medidas preventivas o terapéuticas.

Los subcultivos son ampliamente utilizados para debilitar microorganismos patógenos, por lo que se usó una cepa de *Coccidioides immitis* y se sometió a subcultivo en 180 pases consecutivos. Basados en la patogenicidad generada por la producción de esférulas, se probaron las diferencias en la concentración en medio RPMI 1640. Además, se realizó un ensayo de infección en rebanadas de pulmón de hámster cortadas con precisión buscando alteraciones morfológicas e inflamatorias entre la cepa parental y la cepa subcultivada. Los subcultivos, utilizados para atenuar la virulencia de patógenos, fueron evaluados en *Coccidioides immitis* mediante 180 pases seriales en su forma micelial. Se emplearon dos métodos: la producción de esférulas en medio RPMI 1640-sph mostró diferencias morfológicas que podrían indicar atenuación, mientras que la

evaluación del proceso infeccioso en rebanadas de pulmón reveló un aumento en el infiltrado inflamatorio y macrófagos sin diferencias entre cepa parental y subcultivada. Aunque se observaron escasas artroconidias y esférulas, se necesitan más ensayos para establecer un protocolo de infección en rebanadas de pulmón de hámster. Los resultados en RPMI-sph son prometedores para la fase parasitaria, y la evaluación genotípica podría ofrecer información adicional. Confirmar la atenuación con pasajes seriales podría impulsar el uso de subcultivos en el desarrollo de medidas preventivas como vacunas.

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

La coccidioidomicosis, también conocida como fiebre del Valle de San Joaquín, es causada por el hongo *Coccidioides*, endémico de regiones áridas del hemisferio occidental.¹ Se han identificado dos especies diversas, *Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii*. *C. immitis* se encuentra principalmente en el Valle Central de California y *C. posadasii*, se encuentra en áreas desérticas del centro y sureste de Estados Unidos de América (EUA), México, Centro y Sudamérica.² Estos hongos dimórficos existen en su forma micelial en el suelo, produciendo artroconidias, su forma infecciosa altamente aerolizable.³ La inhalación accidental de estas esporas por mamíferos representa la principal vía de infección, sin embargo, en raras ocasiones, la infección pudiera deberse a inoculación directa a través de la piel.^{1,3} En los tejidos, las artroconidias experimentan cambios morfológicos para transformarse en esférulas llenas de endosporas.^{1,3} En EUA es la segunda infección fúngica más frecuente en humanos y tiene un amplio espectro de manifestaciones clínicas, desde una infección asintomática hasta el involucro sistémico con consecuencias mortales.¹ Al ser un padecimiento infeccioso endémico en nuestra región, el desarrollo de medidas preventivas, como las vacunas, resultan en un campo de oportunidad donde poco se ha logrado a la fecha.

Epidemiología

De acuerdo a los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) en 2017 se reportaron 14, 364 casos, la mayoría en los estados fronterizos de Arizona y California.⁴ En México se reportan tres zonas endémicas: Zona Norte (fronteriza con Estados Unidos, con mayor tasa de incidencia), Zona Litoral del Pacífico y Zona

Central.⁵ No se cuenta con mucha información acerca de la epidemiología en México debido a que desde 1995 dejó de ser un padecimiento de reporte obligatorio.⁶ Sin embargo, se estiman más de 1,500 casos de coccidioidomicosis primaria y 15 casos de enfermedad diseminada anualmente.⁶ Los estados con mayor número de casos son Tamaulipas, Chihuahua, Baja California, Sonora y Nuevo León, siendo este último el de mayor tasa de incidencia, con 2.6 casos por 100,000 habitantes.⁶

Manifestaciones clínicas

La infección por *Coccidioides spp.* es principalmente pulmonar al ser la vía más frecuente de entrada al organismo.^{1,7} En el 60% de los casos los pacientes cursan asintomáticos, mientras que el resto presentan síntomas de 7 a 21 días posterior a la inhalación de artroconidias.^{7,8} Los pacientes comúnmente presentan cefalea, pérdida de peso, tos, dolor pleurítico y un exantema maculopapular, que a menudo pasa desapercibida.¹ El eritema nodoso, las artralgias migratorias, especialmente en las articulaciones de rodillas y tobillos, junto con fiebre, constituyen la tríada conocida como “reumatismo del desierto”.¹ Los hallazgos de laboratorio revelan elevación de la velocidad de sedimentación globular y eosinofilia.^{1,9} En la radiografía de tórax se observan infiltrados neumónicos unilaterales.^{1,10} La presencia de adenopatías hiliares y peritraqueales sugiere diseminación extratorácica.¹ En la fase temprana, las lesiones pulmonares incluyen nódulos y cavidades, evolucionando hacia una enfermedad fibrocavitaria en la fase crónica.¹

En el 5% de los pacientes sintomáticos, aproximadamente el 1% de todas las infecciones, ocurre una diseminación linfática y/o hemática desarrollando una coccidioidomicosis diseminada.⁸ La piel, nódulos linfáticos, sistema nervioso central y los huesos son los principales

sitios afectados.¹⁰ La osteomielitis vertebral es una condición frecuente acompañada de abscesos del psoas y epidurales.¹ La afección articular es común, siendo las rodillas las articulaciones más afectadas. El sistema nervioso central se ve comprometido en el 90% de los casos con consecuencias fatales en caso de no instaurarse el tratamiento apropiado.¹

Las manifestaciones cutáneas de la infección por *Coccidioides spp.* se observan como lesiones reactivas en el contexto de una coccidioidomicosis pulmonar aguda (exantema maculopapular, eritema nudoso, eritema multiforme); como infección cutánea secundaria a diseminación linfática o hematológica, o como una infección cutánea primaria por inoculación directa.⁹ La coccidioidomicosis cutánea primaria tiene un período de incubación de 2 a 3 semanas y se presenta como nódulos, úlceras, placas vegetantes o costrosas, entre otras.⁹

Diagnóstico

La historia clínica, incluyendo el lugar de residencia, antecedente de viaje a áreas endémicas o traumatismos, y la exploración física, nos orientan a sospechar de esta infección micótica. El diagnóstico puede realizarse visualizando, por examen directo, la presencia de hifas o esférulas de *Coccidioides spp.* (ver sección de Micología).^{1,9} En las biopsias de piel se aprecia una reacción inflamatoria granulomatosa con un infiltrado de neutrófilos y/o eosinófilos en estadios agudos, o monocitos y linfocitos en estadios crónicos.⁹ Además de visualizarse el tejido con hematoxilina y eosina (HyE), se deben realizar tinciones especiales como Ácido Peryódico de Schiff (PAS) o Gomori Grocott que confirmen la presencia de esférulas. En las lesiones reactivas no se aprecia el organismo causal. El aislamiento de *Coccidioides spp.* por cultivo es el estándar de oro para el diagnóstico; de acuerdo con su

riesgo biológico este debe realizarse y estudiarse en campañas de bioseguridad nivel 3.^{1,9} Los cultivos de líquido cefalorraquídeo generalmente resultan negativos por lo que la detección por reacción de cadena de polimerasa (PCR) es útil en estos casos.^{1,9}

Usualmente se emplean pruebas serológicas para el abordaje diagnóstico, especialmente cuando la obtención de esputo o muestras tisulares resultan complicadas o cuando los cultivos de hongos no están disponibles. La serología, que identifica los anticuerpos IgG e IgM, se posiciona como el método principal para el diagnóstico y pronóstico.^{1,9} Estos suelen aparecer entre la primera y la tercera semana después del inicio de los síntomas.⁹ Un resultado positivo puede indicar infección primaria, reactivación o enfermedad crónica activa. Los títulos de IgM tienden a disminuir con el tiempo, llegando a ser indetectables en algunos casos después de 4 meses.⁹ Un resultado negativo no descarta la presencia de la infección coccidial, por lo tanto, se recomienda repetir la prueba en un lapso de dos meses y no desestimar los resultados mínimamente reactivos.¹

Micología

Inicialmente fue considerada una entidad ocasionada por un protozooario, de ahí que en 1896, Gilchrist y Rixford denominaron al organismo *Coccidioides* (parecido a *Coccidia*) e *immitis* (en latín, “duro”, que describe el curso clínico).^{11,12} El género *Coccidioides* pertenece a la orden de los Onygenales (división Ascomycota) y tiene la capacidad de degradar la queratina y utilizarla como fuente de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, aminoácidos y otros minerales.^{7,12} Este género de hongos exhibe dimorfismo, un fenómeno que se caracteriza por la generación de formas filamentosas (miceliales) en su fase saprofita en el medio ambiente o cuando se incuban a temperaturas más bajas.⁸ Durante su fase parasitaria, ya sea al invadir

un hospedero animal o al ser incubados a temperaturas altas, experimentan una conversión a formas celulares con similitudes a las levaduras.⁸

Las hifas son septadas y las artroconidias, de paredes gruesas (2 por 4 μm), se generan a lo largo de ellas (desarrollo enteroártrico).⁸ Estas artroconidias suelen estar separadas por células vacías, de paredes delgadas y frágiles (cuerpos disyuntores) originadas por la autólisis de conidias alternas.⁸ Como resultado, las artroconidias se liberan fácilmente con la perturbación del suelo y las corrientes de aire. Al ingresar las artroconidias al hospedero sufren una remodelación de formas rectangulares a esféricas multinucleadas conocidas como esférulas.^{1,8} Esta transformación se ve facilitada por el desprendimiento de la capa externa de artroconidios.⁸ El artroconidio sufre un ensanchamiento formando una estructura esférica cercana de 10 a 20 μm .¹⁰ Conforme sigue creciendo, forma una pared gruesa y alcanza un diámetro de 60 a más de 100 μm .^{8,10} Por duplicación nuclear e invaginación se forman endosporas uninucleares con un tamaño de 2 a 5 μm .^{8,10} Las esférulas maduras pueden contener de 800 a 1000 endosporas que son liberadas por debilitamiento de sus membranas.^{8,10} Cada una de estas endosporas es capaz de formar una nueva esférula.

C. immitis y *C. posadasii* muestran exclusivamente variaciones genotípicas.¹⁰ Fenotípicamente, *C. immitis* crece mucho más rápido en altas concentraciones de cloruro de sodio y se ha descrito un tamaño mayor de sus artroconidias.¹⁰ Ambas presentan crecimiento en medios de cultivo convencionales como Sabouraud dextrosa agar y Sabouraud dextrosa agar con antibióticos, gelosa sangre, etc., incubados a una temperatura de 25 a 28 °C.¹⁰ Sus colonias se desarrollan de tres a cinco días, siendo vellosas, blancas y sin límites en su extensión. Con el tiempo, estas colonias evolucionan hacia una

apariencia algodonosa y pueden adquirir un color pardo.¹⁰

Factores de virulencia

La mayoría de los hongos ascomicetos son saprotróficos en el medio ambiente y están asociados con plantas, pero *Coccidioides spp.* ha desarrollado la capacidad de infectar mamíferos.¹² Para la patogenicidad de *Coccidioides spp.* se requiere la conversión de artroconidios a esférulas, promoviendo un cambio genético para la proliferación y sobrevivencia ante la respuesta inmune del hospedero.^{7,13} Análisis transcriptómicos han detectado genes y vías moleculares cuya expresión difiere entre la fase saprofita e infecciosa en ambas especies de *Coccidioides spp.*⁷ Aunque no se comprenden totalmente los mecanismos de virulencia, las alteraciones genéticas permiten una correlación entre la proteína codificada y su importancia en la infección. La regulación positiva de genes en la fase infecciosa codifican componentes relacionados con la pared celular, el estrés oxidativo, la regulación del pH, el metabolismo de los lípidos, glucosa y proteínas.⁷ La mutación del gen SOWgp, una glucoproteína en la superficie de las endosporas, reduce la adhesión y la virulencia en un modelo de infección murino y el knockout genético de Cps1, un gen que codifica a una proteína de unión a AMP, redujo la virulencia y persistencia de la infección en ratones.⁷ La pérdida de función de la ureasa y la sintasa de quitina en la fase infecciosa disminuyó la alcalinización tisular necesaria y el cambio morfológico hacia esférulas.⁷

Respuesta inmune del hospedero tras la infección

El tipo de respuesta desarrollada tras la infección tiene un papel primordial en el pronóstico, así como el tamaño del inóculo en la presentación clínica.^{1,13} La cantidad de inóculo requerida para iniciar la infección es mínima, y en modelos animales, incluso un solo

artroconidio puede provocar la infección.³

En la mayoría de las infecciones fúngicas, como en el caso de la coccidioidomicosis, los fagocitos, como los neutrófilos, macrófagos y células dendríticas, desempeñan un papel crucial en el control inicial de la infección.⁷ Aunque los neutrófilos pueden fagocitar fácilmente artroconidios y pequeñas endosporas, no parecen ser eficaces en su eliminación total o al fagocitar esférulas de mayor tamaño, con una tasa de destrucción celular inferior al 20%. Los hallazgos histopatológicos suelen mostrar infiltrados de neutrófilos, y estos tipos de células tienden a reclutarse rápidamente en los pulmones durante la coccidioidomicosis pulmonar experimental.⁷ Esto se caracteriza por una respuesta inflamatoria intensa en los pulmones, lo cual puede contribuir al daño tisular y a la formación de granulomas durante la infección.⁷

La mayoría de las personas que experimentan infecciones pulmonares autolimitadas desarrollan hipersensibilidad de tipo retardado con niveles bajos de anticuerpos fijadores del complemento.^{7,13} En contraste, aquellos pacientes con enfermedad diseminada muestran títulos elevados de anticuerpos y no desarrollan hipersensibilidad de tipo retardado.^{7,13} Dectin-1, el receptor tipo Toll 2 (TLR-2) y el IL-1 β R son receptores de reconocimiento de patrones implicados en la infección por *Coccidioides* que activan diversas respuestas inflamatorias y antimicrobianas.⁷ La resistencia a la coccidioidomicosis puede estar asociada con niveles elevados de citocinas proinflamatorias, como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 α , e interleucina 6 (IL-6).⁷ Los linfocitos T proporcionan protección contra la infección temprana de *Coccidioides* en modelos murinos; se ha observado que las respuestas Th1 están comúnmente asociadas con la protección, mientras que una predominancia de la respuesta Th2 conduce a una enfermedad más severa.^{7,13}

Vacunas

Dado que las reinfecciones son muy poco frecuentes, parece factible el desarrollo de inmunidad por vacunación al estimular una respuesta celular de linfocitos T (TH1 y TH17) más que una respuesta humoral.¹³ El primer ensayo se realizó con esférulas inactivadas con formalina sin una reducción significativa en la incidencia o severidad de la enfermedad.⁷ Antígenos como SOW, ELI1, HSP60, aspartil proteasa y el antígeno específico de *Coccidioides*, se han utilizado para inmunizar ratones, con una reducción sustancial de la carga fúngica, pero sin eliminación completa del hongo.⁷ Un ensayo con una cepa atenuada por delección genética de sintasas de quitina (CTS1 y CTS3) demostró no inducir enfermedad en un modelo murino pero sí una respuesta protectora.^{7,14} Los antígenos purificados como la ureasa y el ADN de ureasa expresado ectópicamente mediante un plásmido de mamífero indujeron una respuesta inmunoprotectora de tipo Th1 contra la coccidioidomicosis en un modelo de ratones.⁷ La inmunidad mediada por células pareciera primordial, con un estímulo humoral mínimo y a pesar de resultados prometedores en modelos animales aún se requieren más pruebas para determinar las formulaciones, proteínas y adyuvantes necesarios para conferir protección.

ANTECEDENTES

La patogénesis se refiere a la capacidad de un microorganismo para infectar a un hospedero y causar enfermedad por una interacción de factores específicos, adaptándose al entorno tisular resistiendo los ataques del sistema inmune.¹⁵ Esto implica determinantes como genes o productos génicos, incluyendo moléculas enzimáticas conocidas como factores de virulencia.¹⁵ La virulencia se refiere a la capacidad del patógeno para multiplicarse y causar daño al hospedero; es necesario que el hongo esté activamente invadiendo los tejidos para causar enfermedad.¹⁵ Dependiendo de las características fenotípicas y genotípicas del microorganismo y de la respuesta inmune del hospedero estos factores de virulencia pueden evaluarse por diferentes métodos. La identificación de los factores de virulencia descritos en la literatura, y de los organismos susceptibles a la infección, permiten guiar los ensayos futuros sobre nuevas cepas y medidas preventivas o terapéuticas.

Pérdida de la virulencia con subcultivos

Los subcultivos han sido extensamente empleados para atenuar microorganismos patógenos. Se ha observado que los pasajes secuenciales in vitro de varios microorganismos pueden inducir cambios sustanciales tanto en sus características fenotípicas como genotípicas.²²⁻²⁵ Por ejemplo, el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), derivado de *Mycoplasma bovis* y atenuado tras ser subcultivado 230 veces, demostró que fue secuendario a deleciones y duplicaciones presentes en su cromosoma, correlacionándose con la pérdida de su virulencia.²² La degeneración fúngica, es una característica frecuente en la mayoría de los hongos cuando se cultivan en medios artificiales en subcultivos sucesivos.²⁶⁻²⁹ Los cambios resultantes abarcan

cambios fenotípicos y la atenuación de la virulencia, involucrando aspectos como la pigmentación, el crecimiento, la morfología, la producción de esporas y alteraciones en los productos metabólicos.^{26,27} La pérdida de virulencia por subcultivos en hongos no ha sido valorada para *Coccidioides spp.* Sin embargo, en nuestra institución, el Dr. Adrián Martínez Moreno, en su tesis para especialización en Dermatología, valoró el efecto de 100 pasajes *in vitro* de una cepa de *C. immitis* sobre la virulencia en macrófagos.³⁰ El Dr. Martínez Moreno y su equipo de trabajo demostró una mayor reacción inflamatoria, presencia de esférulas e hifas y mayor crecimiento fúngico por absorbancia en la cepa parental, representando una disminución en la virulencia.³⁰

Modelos utilizados para la medición de la capacidad de virulencia de *Coccidioides immitis*

1. Evaluación de la capacidad de producción de esférulas

En un medio de cultivo específico, se requiere un aumento de temperatura a 37°, así como un aumento en el nivel de dióxido de carbono (CO₂) atmosférico, entre 5 a 15%.^{13,16} *In vitro*, las esférulas se pueden obtener utilizando medio Converse o RPMI1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS; medio RPMI-sph).¹⁶

El éxito de cultivar esférulas de *Coccidioides spp.* *in vitro* radica en la obtención del medio ambiente adecuado, simulando el tisular, y limitando la producción de hifas. Se han analizado diversos medios de cultivo complejos con esta finalidad, con resultados variables por la persistencia de hifas y bajos rendimientos de esférulas y endosporas.¹⁶ Uno de los medios más exitoso para el crecimiento continuo de

esférulas es el medio Converse modificado, que es una mezcla de sales, glucosa y el detergente N-Tamol.¹⁶ N-Tamol mejora la conversión a esférulas y la endosporulación.^{16,17} Sin embargo, este medio no es el óptimo para su estudio con células de mamíferos y los cultivos habitualmente contienen algunas hifas.

En 1985, Petkus y colaboradores¹⁶, desarrollaron un medio de cultivo, más sencillo de realizar, que permitió la formación de esférulas por un tiempo prolongado (84 días), además de contar con las condiciones adecuadas para mantener el crecimiento de linfocitos. Así, este medio resulta adecuado para la inducción de producción de esférulas, de su cultivo, mantenimiento, además de permitir la evaluación de la respuesta inmune frente a la infección por *Coccidioides spp* al ser compatible con las células de mamíferos, como los linfocitos.^{16,18} El análisis de los cultivos detectó que a las 24 h el 9% de las artroconidias se habían transformado en esférulas, 80% a los 4 días y entre el 95-99% a los 8 días.¹⁶ El retiro de N-Tamol posterior al establecimiento del cultivo con esférulas no modificó el mantenimiento o el tamaño de las esférulas.¹⁶ La metodología usada en el estudio de Petkus y colaboradores (1985) se describe en la sección de Metodología.¹⁶

Aunque las condiciones previamente descritas, para los medios de cultivos, buscan simular el ambiente tisular y favorecer la formación de esférulas también hay evidencia de que el contacto con neutrófilos y otros fagocitos pueden estimular esta conversión.^{8,13} En las lesiones pulmonares crónicas, donde no hay neutrófilos, ocasionalmente se observa la reversión a hifas que contienen ensanchamientos que parecen ser intentos abortivos de formar esférulas.¹³

2. Modelos animales

Todos los mamíferos son susceptibles a la infección.⁷ Los primates y cánidos parecen tener cuadros más graves; el ganado vacuno, los bisontes, los cerdos, las ovejas y las cabras, de las regiones endémicas, tienen altas tasas de infección/exposición sin presentar cuadros pulmonares ni enfermedad grave.⁷ Roedores de áreas endémicas como ratones ciervo (*Peromyscus maniculatus*), rock pocket mouse (*Chaetodipus intermedius*), ratones saltamontes (*Onychomys torridus*), ratas canguro (*Dipodomys*), zarigüeyas (*Perognathus*) y ardillas de tierra (*Citellus*), tienen el papel de vectores indirectos de la enfermedad.^{10,11} Para los estudios de virulencia se han usado ratones BALB/c y C57BL/6, los cuales son muy susceptibles a la infección, y DBA/2 y Swiss Webster con menor susceptibilidad.^{7,19} En el 2000, Finkelievich y colaboradores, propusieron un modelo de infección usando hámsters (*Mesocricetus auratus*) inoculados intracardiamente, logrando una infección diseminada y fungemia persistente.²⁰ La presencia de *C. immitis* se evidenció en cerebro, pulmones, riñones, hígado y bazo.²⁰

2.1 Modelo de infección en rebanadas de pulmón cortadas con precisión

La demanda de modelos experimentales que ofrezcan una representación más precisa de la estructura tridimensional in vivo del pulmón, en comparación con las líneas celulares cultivadas en monocapa, ha generado un creciente interés en los cultivos de tejidos ex vivo.²¹ Las rebanadas pulmonares cortadas con precisión (precision-cut lung slices, PCLS) constituyen un sistema ex vivo que reproduce la arquitectura tridimensional del tejido, la composición celular, la complejidad de la matriz, la función metabólica y la respuesta inmune.^{21,22} Las PCLS se han empleado en investigaciones

relacionadas con la toxicidad, biotransformación, metabolismo de xenobióticos y el análisis patogénico de agentes infecciosos como Coronavirus, retrovirus, influenza y parainfluenza, virus del complejo respiratorio bovino, virus sincitial respiratorio, *Chlamydothila pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium abscessus*.²¹⁻²³

La creación específica de PCLS facilita el análisis pareado de diversos tratamientos en un mismo hospedero, permite representar la heterogeneidad del tejido y, por ende, de la enfermedad, y puede aplicarse para modelar ex vivo el inicio y la progresión de la enfermedad, mediante la exposición a factores estresantes, citocinas, enzimas, factores de crecimiento o agentes ambientales.²²

JUSTIFICACIÓN

La coccidioidomicosis es una enfermedad infecciosa endémica de nuestra región y representa un reto clínico-terapéutico debido a la gravedad y variedad de las manifestaciones clínicas. El análisis de una cepa de *C. immitis* subcultivada sobre la infección en rebanadas de tejido pulmonar murino cortados con precisión permitiría estudiar el efecto en la virulencia en un modelo animal accesible y fácil de manipular en el laboratorio. Además, la producción de esférulas en un medio de cultivo, de la cepa parental comparada con la cepa subcultivada, pudiera exponer cambios en la virulencia obtenida con los pasajes seriales. Así, la cepa subcultivada atenuada permitiría el desarrollo de estrategias de prevención como una vacuna con hongos vivos atenuados o componentes estructurales fúngicos contra la coccidioidomicosis.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Disminuye la virulencia de un aislamiento de *Coccidioides immitis* mediante pasajes seriales?

HIPÓTESIS

El pasaje *in vitro* por 180 veces de un aislamiento clínico de *Coccidioides immitis* disminuye su virulencia en comparación con la cepa parental.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar el efecto 180 pasajes *in vitro* de una cepa de *Coccidioides immitis* sobre su virulencia en rebanadas de tejido pulmonar de hámster cortados con precisión y su capacidad de producción de esférulas en un medio de cultivo.

Objetivos específicos

1. Continuar con el subcultivo de un aislamiento clínico de *C. immitis* con código interno AK050 y registro hospitalario 0927297-9 hasta completar 180 pases en medio Agar Mycosel.
2. Analizar el efecto del subcultivo 180 (p180) de una cepa de *C. immitis* sobre producción de esférulas en medio RPMI 1640 y compararlo con la cepa parental (p0).
3. Analizar el efecto del subcultivo de una cepa de *C. immitis* sobre la infección en un modelo de rebanadas de tejido pulmonar de hámster cortados con precisión.

METODOLOGÍA

Microorganismo

Se selecciona una cepa parental del aislamiento clínico de *C. immitis* con código interno AK050 y registro hospitalario 0927297-9. El subcultivo se hará en medio Agar Mycosel hasta completar 180 pasajes.

1. Evaluación de la producción de esférulas en medio RPMI 1640

Diseño del estudio

Experimental y comparativo

Metodología

La metodología empleada para la producción de esférulas es similar a la descrita por Petkus, et al (1985)¹⁶, sin N-Tamol. Esta consistió en:

1. Se obtuvieron cultivos de *Coccidioides immitis* en agar avena de p0 y p180.
2. Se realizó el conteo de artroconidias para ambas muestras (pases) con 10 ml de PBS estéril y palillos de madera estériles, separando el micelio del agar con técnica de barrido. Se filtró la solución obtenida con MicroCloth y se separó una muestra de 100 μ L de la solución filtrada más 100 μ L de formol para su inactivación en alícuotas. Se mantuvieron ambas alícuotas bajo luz ultravioleta por 20 min y posteriormente, usando un hemocitómetro, se realizó el conteo final de artroconidias. (Figura 1, A y B)
3. Se igualó la cantidad de artroconidias para ambos pases (p0 y

p180), para un inóculo final de 500,000 artroconidias y se obtuvo un pellet mediante centrifugación a 5000 rpm por 15 min.

4. En 2 matraces de 50 ml, uno para la cepa parental y otra para la cepa subcultiva 180, se agregaron 10 ml de RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino adicionado con 100 uL de una solución de estreptomycin y penicilina. Los pellets correspondientes fueron colocados en cada matraz consiguiéndose una concentración final de 50,000 artroconidias por ml.
 1. Ambos matraces fueron colocados en agitación en una incubadora con 5% de CO₂ a 37°C por 24 h, sin sellar completamente.
 2. A las 24 h se sellaron completamente las tapas de los matraces y se recolocaron en la incubadora de CO₂ en agitación continua.
 3. A las 48 hrs se filtraron ambos cultivos con 4 capas de gasa estéril con el objetivo de eliminar las posibles estructuras hifales. En este tiempo se realizó el primero conteo con hemocitómetro, posterior al mismo protocolo de inactivación (100 µL de medio de cultivo y 100 µL de formol más 20 min bajo luz ultravioleta).
 4. La solución sobrante en las alicuotas, después de cada conteo, se centrifugó a 5000 rpm por 15 min y los pellets obtenidos fueron observados en el microscopio de luz buscando artroconidias o micelio.
 5. Los matraces se regresaron a la incubadora en las condiciones previas y se realizaron conteos de esférulas, sin repetir el proceso de filtración con gasas, cada 48 horas hasta 144 hrs (6 días). El paso 4 igualmente fue repetido posterior a cada conteo

de esférulas.

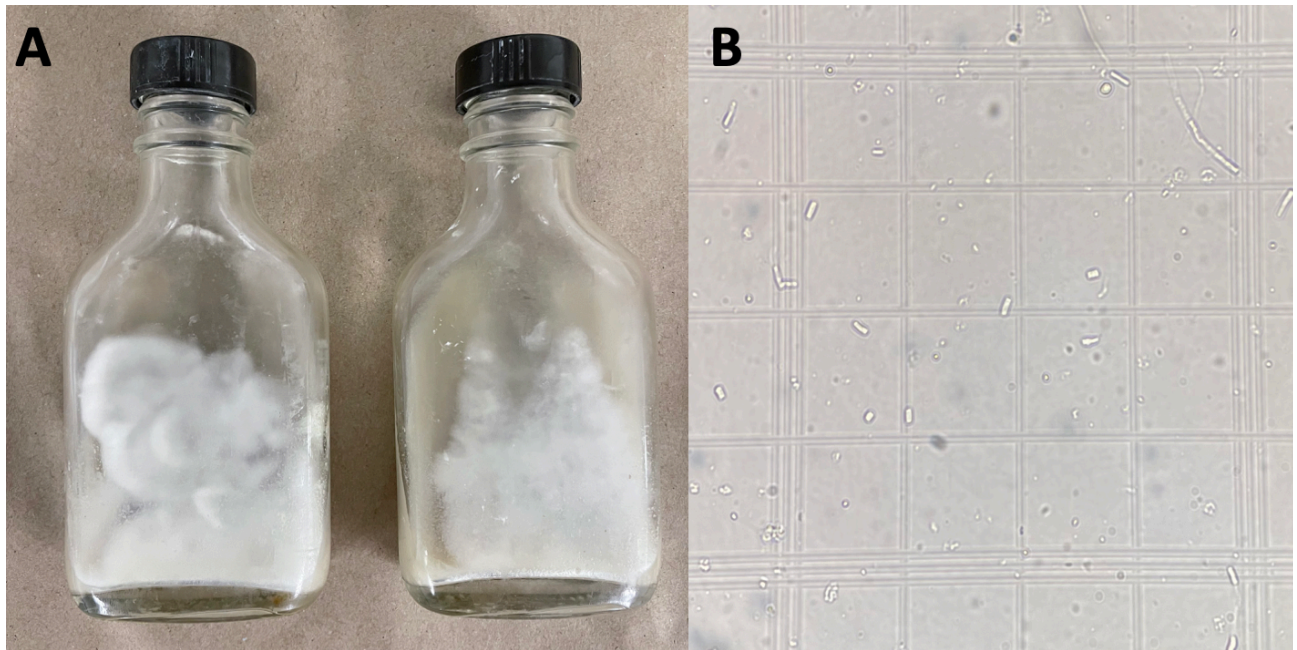


Figura 1. A, Cultivos de *C. immitis*: Colonia blancas, vellosas e ilimitadas correspondientes a la cepa parental (izquierda) y subcultivada tras 180 pasajes seriales (derecha). **B,** visualización de artronidias de *C. immitis* en hemocitómetro para el conteo.

2. Análisis de virulencia en rebanadas de tejido pulmonar de hámster cortados con precisión

Diseño del estudio

Experimental y comparativo

Metodología

La obtención y procesamiento de las rebanadas de tejido pulmonar de hámster cortados con precisión previo a la infección se logró en conjunto con el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del

Instituto Mexicano del Seguro Social. La metodología utilizada es la descrita por Molina, et al (2020)¹⁹ y Carranza, et al (2017)²¹. Todo el proceso se realizó en condiciones asépticas y con material esterilizado.

2.1 Obtención de rebanadas de tejido pulmonar cortados con precisión

1. Se utilizó un hámster hembra de la raza *Mesocricetus auratus* de 8 meses de edad. El hámster fue sacrificado con una sobredosis de pentobarbital sódico vía intraperitoneal en una dilución 1:10.
2. Se realizó una disección desde la línea media del abdomen hacia el tórax y cuello para la exposición de los pulmones y tráquea.
3. La tráquea fue canulada y se infiltró agarosa de bajo punto de fusión al 0.7% (Sigma-Aldrich, Co. St. Louis, Mo. USA) a 37°C hasta llenar los pulmones y se cubrieron con hielo para solidificarla.
4. Los pulmones fueron colocados en solución de Krebs-Henseleit (KB), pH 7.4, (6.9 g NaCl, 0.36 g KCl, 0.13 g KH₂PO₄, 2.11 g NaHCO₃, 4.50 g D-glucosa anhidrida, 0.25 g MgSO₄· 7H₂O, 0.425 g CaCl₂·2H₂O en 1 L de agua MilliQ) a 4°C para su limpieza.
5. Al obtener la consistencia adecuada, se realizaron múltiples biopsias por sacabocado de 8 mm en el tejido pulmonar infiltrado con agarosa para su posterior procesamiento en un rebanador Krumdieck (Alabama Research and Development, Munford, AL., USA) con flujo constante de buffer KB a 4°C y una mezcla de gas carbógeno [O₂/CO₂ (95:5) %] para lograr un grosor de 350 a 400 µm y colocarse en un vaso de precipitado con buffer KB frío.

6. Posteriormente las rebanadas se colocaron en microplacas de 6 pozos (varias) con 3 mL de medio Tirosina-Hierro-Extracto de levadura (TYI) sin suplementos pH 6.8 (0.5 g K₂HPO₄, 0.3 g KH₂PO₄, 2 g NaCl, 10 g peptona de caseína, 5 g extracto de levadura, 5 g glucosa, 0.5 g L-cisteína, 0.2 g ácido ascórbico, 0.0114 g citrato férrico amónico en 500 mL de agua MilliQ).
7. Las microplacas se incubaron a 37°C y 5% CO₂ en agitación lenta (~25 rpm) y después de 30 minutos se realizó el primer cambio de medio para eliminar residuos de agarosa. Este recambio se realizó cada 30 minutos, por 1 hora (2 recambios) con buffer PBS-amikacina 200 µg/mL y medio TYI a una proporción 1:1.
8. En el cuarto cambio de medio se colocaron las PCLS en microplacas de 24 pocillos con 1 ml de medio DMEM/F12 suplementado con suero fetal bovino al 10 % y glucosa 25 mM.

2.2 Infección de rebanadas de tejido pulmonar cortados con precisión

1. Se distribuyeron las PCLS en microplacas de 24 pocillos, 3 rebanadas para cada tiempo, de cada cepa (parental y subcultivada 180), y sus respectivos controles, con 1 ml de medio DMEM/F12, pH 7.3 (7.8 g de medio DMEM/F12, 0.6 g NaHCO₃, 12.5 mL glucosa, 0.5 mL ITS, 50 mL SFB en 500 mL de agua MilliQ).
2. Se añadió inóculo de *Coccidioides immitis* de las diferentes cepas con una equivalencia a 20,000 artroconidias por ml.
3. La microplaca, con las PCLS infectadas, se trasladó a la incubadora de CO₂ a 5% a 37°C por 6 horas de manera estática.
4. Se retiró la microplaca de la incubadora para realizar dos

lavados en cada pocillo con 1 ml de RPMI 1640 y se añadió finalmente 1 ml de medio DMEM/F12 fresco.

5. Se regresó la microplaca a incubación en cámara de CO₂, en las mismas condiciones previas, con agitación lenta por 60, 108 y 132 horas.
6. Las rebanadas retiradas a cada tiempo se fijaron en formaldehído neutro al 10%.
7. Se colocaron en parafina, para la realización de la técnica histológica con tinciones PAS y Gomori Grocott para su análisis histopatológico.

2.3 Análisis histopatológico

Las PCLS de cada tiempo de incubación, por cada cepa (P0 y P180) y los controles, fueron fijadas en formaldehído neutro al 10% durante 24 h a temperatura ambiente. Se incluyeron en parafina para la técnica histológica de rutina y se obtuvieron cortes de 7 µm de grosor para teñirse con hematoxilina y eosina y Gomori-Grocott. Se colocaron en portaobjetos con resina sintética y se observaron bajo microscopía de luz de campo claro.

RESULTADOS

1. Evaluación de la producción de esférulas en medio RPMI 1640

Se observaron esférulas en ambos cultivos, con mayor concentración en la cepa parental. Además se visualizaron artroconidias, artroconidias con ensanchamientos e hifas, aún posterior al filtrado (**Figura 2, A-F**). El inóculo inicial produjo una concentración de 420,000 esférulas/ml para p0 (parental) y 272,000 esférulas/ml para p180 en el primer tiempo, a las 48 h. Esta concentración disminuyó a las 96 h, con una concentración de 236,000 esférulas/ml para p0 y, en mayor medida, 64,000 esférulas/ml para p180. De manera similar, a las 144 h, persistió esta disminución en la concentración con 108,000 esférulas/ml en p0 y 4,000 esférulas/ml en p180 (**Figura 3**). Los decrementos para p0 corresponden a una reducción del 76.4% a las 96 h, y del 45.7% a las 144 h respecto a la concentración previa. Para p180 la reducción fue del 82.7% a las 96 h y del 93.75% respecto a la concentración previa. Entre ambas cepas existió una diferencia de 40,000 esférulas/ml en el primer tiempo, la cual se amplió considerablemente en los siguientes tiempos; a las 96 h la diferencia fue de 172,000 esférulas/ml y a las 144 h de 104,000 esférulas/ml. La tendencia inicial de formación de esférulas y preservación del cultivo fue mayor para la cepa parental comparado con la cepa subcultivada, que formó menos esférulas con una reducción progresiva más pronunciada en la concentración.

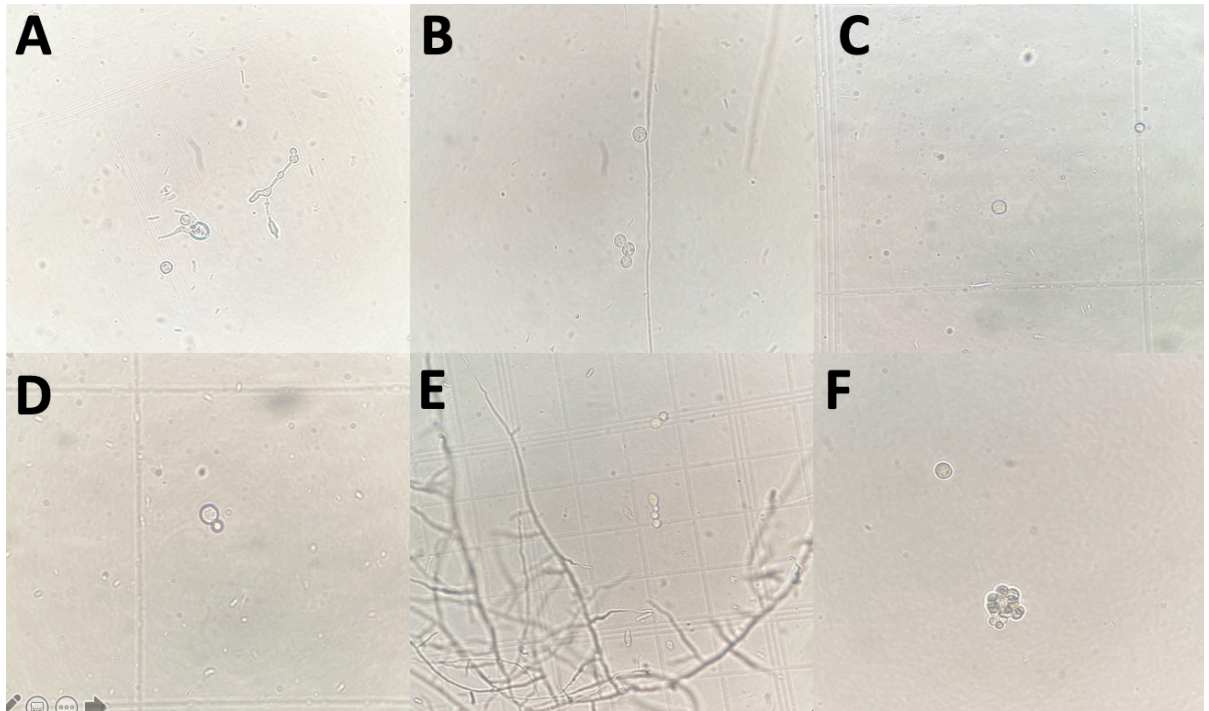


Figura 2. Visualización de esférulas con endosporas, el conteo con hemocitómetro para p0 a las 48 h (**A**), 96 h (**B**) y 144 h (**C**) y p180 a las 48 h (**D**), 96 h (**E**) y 144 h (**F**).

El excedente obtenido tras el muestreo inactivado para el conteo fue centrifugado para la visualización de artroconidas e hifas bajo examen directo con azul de lactofenol. Para ambos cultivos, y en todos los tiempos, se evidenciaron estas estructuras. Incluso al momento de hacer el conteo de las esférulas, pudieron apreciarse en el hemocitómetro aunque en menor cantidad (**Figura 4**).

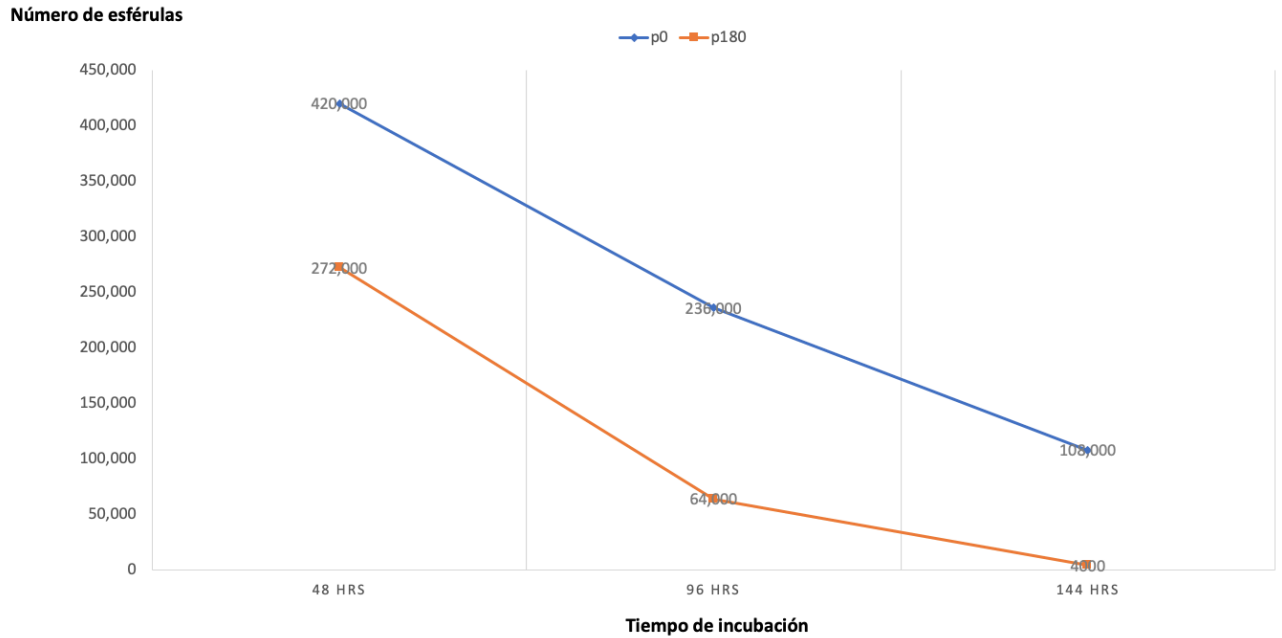


Figura 3. Producción de esférulas en medio RPMI de la cepa parental (p0) y subcultivada (p180) de *C. immitis* a diferentes tiempos de incubación .

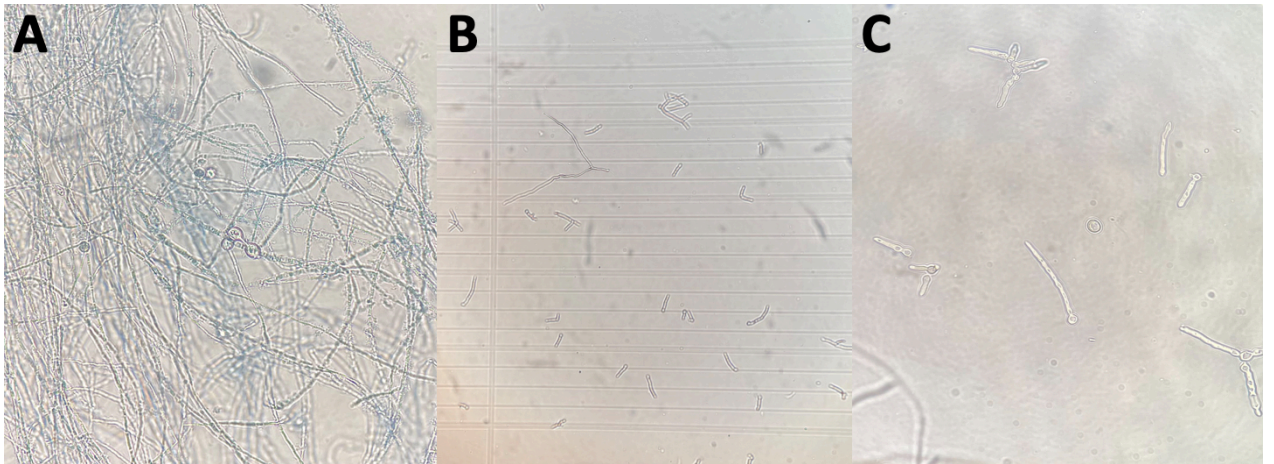


Figura 4. **A**, Identificación de micelio con artronidias en proceso de transformación a esférulas al teñirse con azul de lactofenol. **B**, presencia de arthroconidas con ensanchamientos apicales. **C**, presencia de múltiples arthroconidas en transformación a esférulas y

una esférula con endosporas al centro del campo.

Los cultivos de *Coccidioides immitis* en medio RPMI 1640 se observaron ligeramente más turbios para ambas cepas, antes del filtrado a las 48 h, por la presencia de micelio; esto mejoró posterior al filtrado en 4 capas de gasa al ser eliminadas gran parte de las hifas (**Figura 5**).

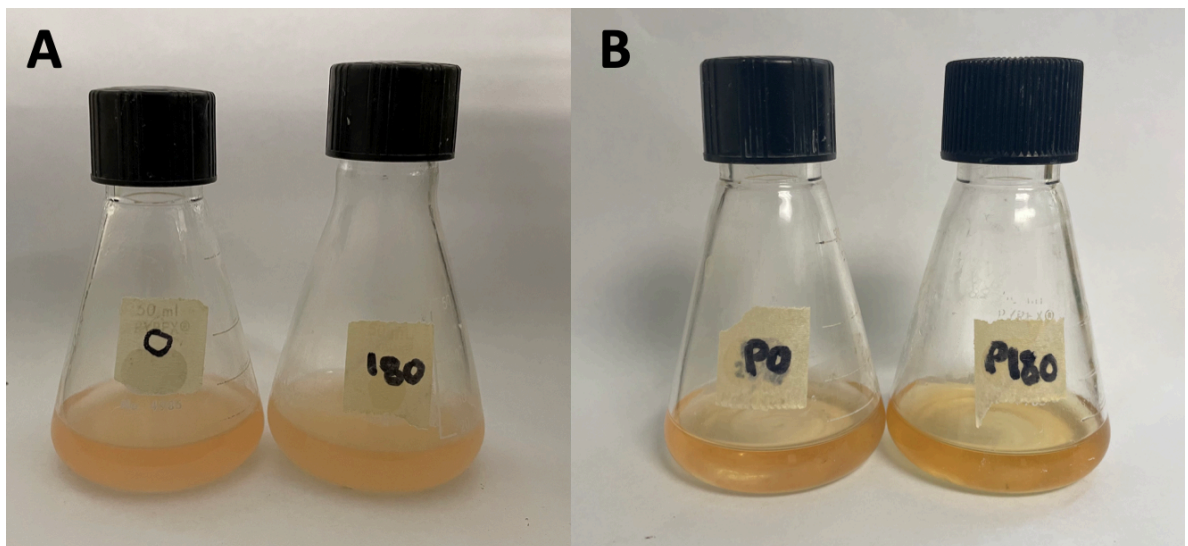


Figura 5. A, cultivos de p0 y p180 en medio RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal 10% tras 48 h de incubación. **B**, mismos medios de cultivo posterior al filtrado con 4 capas de gasas estériles.

2. Análisis de virulencia en rebanadas de tejido pulmonar de hámster cortados con precisión

El estudio de los cambios morfológicos en las PCLS por histopatología se realizó para cada cepa y cada tiempo, comparándolos con los controles, con HyE y Gomori Grocott. Se valoró la estructura normal pulmonar en cuanto a su arquitectura por neumocitos tipo I y tipo II, tejido conectivo a nivel septal, con sus vasos sanguíneos y linfáticos. Se tomaron imágenes representativas de cada uno de los procesos identificados y se presentan en la **Figura 6**.

En las PCLS teñidos con HyE, para los controles sin infección, el tejido pulmonar cultivado a 60hr (**Figura 6, A**) 108 hr (**Figura 6, B**) y 132 hr (**Figura 6,C**) se observó con arquitectura conservada en los diferentes tiempos con congestión vascular adicional a las 60 h. El cultivo en los diferentes tiempos de las rebanadas de tejido pulmonar infectadas por *Coccidioides immitis* a pasaje 0 (**Figura 6,D-F**) y 180 (**Figura 6,G-I**), muestran engrosamiento de septos alveolares e infiltrado inflamatorio en parches caracterizado por polimorfonucleares y acúmulos de macrófagos espumosos. El infiltrado inflamatorio polimorfo fue mayor para el tiempo 108 y 132 h. No hubo diferencia entre el pase 0 y el pase 180 en cuanto al grado de infiltrado inflamatorio ni presencia de acúmulos de fagocitos.

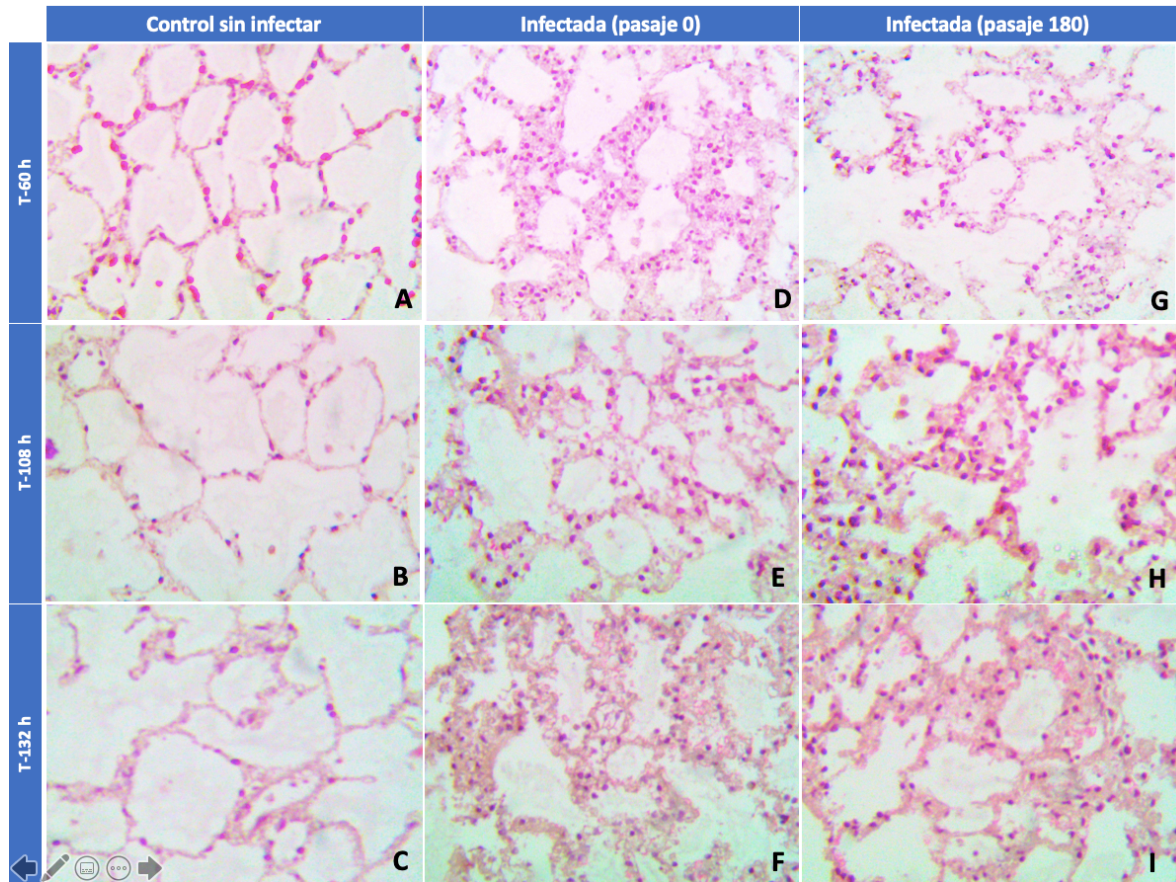


Figura 6. Cultivo de rebanadas de pulmón de hámster infectadas con *Coccidioides immitis* a tiempos de 60 h, 108 h y 132 h. H y E (40x).

También se realizó la tinción de Gomori Grocott, donde se observaron escasas artroconidias y esférulas. No existió diferencia entre estos hallazgos para ninguna de las rebanadas infectadas a ningún tiempo.

DISCUSIÓN

La coccidioidomicosis es una infección causada por el hongo dimórfico *Coccidioides spp.*, endémico en regiones áridas de América, incluyendo el norte de México, en la franja fronteriza con Estados Unidos de América. Se han identificado dos especies, *Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii*, que se propagan a través de artroconidias altamente volátiles. Esta infección fúngica puede variar clínicamente desde un proceso asintomático, como en la mayoría de los casos, hasta casos sistémicos de alta mortalidad. Aunque la inhalación accidental es la principal vía de entrada de las artroconidias en los mamíferos, la inoculación directa a través de la piel es rara pero posible. El diagnóstico se realiza mediante el aislamiento del hongo a través de cultivos, considerado el estándar de oro o por visualización de artroconidias, hifas o esférulas en muestras de los tejidos afectados. Ambas especies tienen crecimiento en medios de cultivo convencionales incubados a una temperatura de 25 a 28°C para su forma micelial y para su forma parasitaria, fuera del hospedero, se requiere una temperatura de 37°C, CO₂ atmosférico entre 5 a 15% y medio Converse o RPMI1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%.

La patogenicidad de *Coccidioides spp.* se basa en la conversión de artroconidias a esférulas, un proceso que implica cambios en la expresión genética. Esta conversión en el proceso infeccioso natural facilita la proliferación y supervivencia del hongo frente a la respuesta inmune del hospedero. Si se modifican los factores genéticos que conducen a este cambio estructural, como en algunos modelos experimentales, el resultado es una pérdida de la virulencia. Ejemplo de esto son la mutación del gen SOWgp que disminuye la adhesión en la matriz extracelular, la ausencia de infección en cepas con knockout

de CPS1 y la pérdida de función de la ureasa y sintasa de quitina que disminuye la alcalinización tisular y el cambio morfológico.^{7,14} Tras la exposición en los tejidos a un inóculo, incluso pequeño, las células fagocíticas, como neutrófilos, desempeñan un papel crucial para el control inicial. Las esférulas de mayor tamaño son más difíciles de eliminar, contribuyendo a una respuesta inflamatoria intensa. Esta respuesta, junto con el tamaño del inóculo, impacta el pronóstico y la presentación clínica de la infección.

Nuestro estado se ubica en el área endémica de coccidiomicosis, con una mayor incidencia de infectados en comparación con el resto del país. La detección de casos, la evolución clínica observada, la disponibilidad de fármacos seguros y los esquemas prolongados, pone en evidencia la falta de medidas preventivas para esta enfermedad. Así, con un aislamiento clínico de *Coccidioides immitis*, se buscó la disminución de su virulencia por medio de subcultivos como se ha reportado principalmente con agentes bacterianos y virus. Estos cambios van desde aspectos fenotípicos con variaciones en la pigmentación, en la apariencia y el ritmo de crecimiento de los cultivos, hasta diferencias genotípicas, que explicarían dichos cambios, o que aún están en estudio por no tener una presentación valorable con métodos existentes. Estos no sólo tiene importancia en medios de cultivo, sino que, entendiendo que son parte esencial de su desarrollo y su interacción con el medio ambiente, se traducen en su capacidad patogénica. En nuestro caso, parte de los cambios fenotípicos observados en los últimos pases seriales en agar Mycosel (aproximadamente entre p165-p180) fue un mayor tiempo para el crecimiento micelial y esporulación de 2-3 días más del previsto.

El uso de subcultivos de *Coccidioides immitis* para atenuar cepas de este hongo no ha sido publicado. Basados en la importancia de la producción de esférulas para el desarrollo de la patogenia de

Coccidioides spp., y con la hipótesis de la pérdida de virulencia con los subcultivos, se quiso comparar la capacidad de cambio morfológico entre la cepa parental y el subcultivo a 180 pases seriales. Los protocolos existentes para la fase parasitaria obtenida con cultivos específicos, a mayores temperaturas (37°C) y con CO₂ atmosférico de 5-15%, describen una metodología sencilla de realizar. Los resultados obtenidos con nuestro ensayo demostraron una menor producción de esférulas, y por ende, de concentración en el medio, tras 48, 96 y 144 horas. Con el paso del tiempo, en ambas cepas, se observó una disminución progresiva, pero no proporcional ni regular, en la obtención de esférulas y el cultivo no logró una estabilidad tras 6 días. El filtrado a las 48 horas eliminó las hifas, dejando mayor cantidad de medio para las esférulas y la proliferación de sus endosporas. Sin embargo, algunas artroconidias e hifas fueron evidenciadas a las 96 y 144 horas que pudieron deberse a un escape al filtrado o a una transformación posterior a pesar de las condiciones ambientales. El cambio de medio, a uno nuevo y fresco, en tiempos posteriores (entre 4 y 5 días del cultivo inicial) podría mejorar la producción y manutención de esférulas. En este ensayo además no se utilizó N-tamol, un surfactante que demostró una conversión más rápida hacia esférulas; su posterior retiro en cultivos ya establecidos no modificó la presencia de esférulas.^{16,17} Aunque en los primeros ensayos con RPMI 1640 no se utilizó N-tamol, sí se logró la producción de esférulas en una tasa más lenta pero sin establecimiento final de cultivos puros.¹⁶ Esto podría ser la razón de que después de 6 días no se lograron establecer nuestros cultivos y la reducción progresiva de la concentración de esférulas en ambos pases. En los resultados del Dr. Martínez, en su análisis histopatológico de la monocapa de macrófagos, se observó el desarrollo de esférulas en la parental pero no en la cepa atenuada que se relaciona con nuestros resultados en medio RPMI 1640-sph.³⁰ Sí esta diferencia en la capacidad de

transformarse a la forma parasitaria tuvo repercusión a nivel genético tendría que evaluarse por otros métodos en ensayos posteriores.

El uso de modelos experimentales con animales para el estudio de la coccidiodomycosis ha permitido dilucidar su patogenia, respuesta inmune, evolución clínica y han permitido la evaluación de agentes terapéuticos. El uso de ratones de cepas genéticamente caracterizadas ha sido lo más empleado por su susceptibilidad a la infección y por su accesibilidad en cuanto a costos y manejo. Sin embargo, otros animales, principalmente roedores, se han utilizado tras comprobarse su susceptibilidad. Los hámsteres dorados, *Mesocricetus auratus*, han probado ser susceptibles a infección por varios hongos, entre ellos *Coccidioides spp.*^{5,20} En el ensayo realizado por Finkelievich, et al. (2000) se demostró enfermedad diseminada en esta especie, con identificación y aislamiento de *Coccidioides immitis* tras inoculación intracardiaca además de una respuesta inflamatoria granulomatosa y de polimorfonucleares en los órganos afectados. Por el mayor tamaño de la especie para la manipulación durante la obtención de las rebanadas de pulmón y la susceptibilidad demostrada se decidió su empleo en el presente ensayo.

Tras el ensayo en las PCLS se observó infiltrado inflamatorio y acúmulo de macrófagos espumosos para las rebanadas infectadas en ambos pasajes. No se observaron cambios en los controles salvo una mayor congestión vascular en el último tiempo. No se evidenciaron esférulas ni artroconidias de manera considerable en ninguna rebanada. No existieron diferencias entre la cepa parental y la subcultivada en ninguna de las tinciones elaboradas. Existen algunos factores en el ensayo que pudieran explicar estos resultados.

Los roedores, como los hámsteres, son susceptibles a la infección, y su presencia en las regiones endémicas favorecen la diseminación del

hongo encontrado en sus restos al fallecer. El ensayo previo en hámsteres realizado por Finquelievich, et al (2000) no especifica la edad, sólo el peso (150 g). Con otras especies, como en modelos murinos, se usan animales de 8-12 semanas de edad que se relaciona con un desarrollo menos establecido de la respuesta inmune y en una mayor susceptibilidad infecciosa.

La cantidad del inóculo necesario para la infección en este modelo no ha sido establecida porque se carecen de estudios similares. Si bien en otros modelos infecciosos la cifra necesaria pareciera ser mínima, no fue lo esperado en nuestro experimento con un inóculo de 200,000 arthroconidias. El tiempo para la infección estática tampoco está bien establecido, podrían ser necesarios periodos más prolongados de exposición al hongo que los necesarios en ensayos con bacterias. Además el medio de cultivo utilizado para las PCLS pudiera no ser el necesario para la sobrevivencia y mantenimiento del hongo. La ventaja del medio RPMI 1640 suplementado al 10% con suero bovino fetal es el de ofrecer un medio adecuado para la formación de esférulas y la preservación de células de mamíferos, como polimorfonucleares y linfocitos; así, el cambio de medio (RPMI 1640 por DMEM/F12) podría resultar beneficioso para las PCLS y las cepas de *Coccidioides immitis* ensayadas.

La interacción entre el hongo y las células de las rebanadas, principalmente los neumocitos, podría ser otra limitante. Cada sección pulmonar se encuentra compuesta de células epiteliales de la vía aérea inferior, conocidas como neumocitos tipo I y II, además de macrófagos y otras células inflamatorias residentes en el tejido conectivo.³¹ Las células epiteliales alveolares son indispensables para el reclutamiento de los mediadores inmunes y presentan múltiples receptores de reconocimiento de patrones.³² Nuestro principal interés se basaba en el daño al tejido pulmonar y la respuesta inmune celular

que pudiera ser inducida. Al ser un tejido *ex vivo*, carece de flujo sanguíneo que favorezca la migración celular a distancia tras la infección y los hallazgos se basarían en las células residentes. Aunque poco se conoce de las respuestas del epitelio respiratorio ante las infecciones fúngicas, pareciera ser mínima, con escasos reportes en humanos y modelos animales.³¹ Los neumocitos tipo I secretan IL-10 y los neumocitos tipo II expresan CD200 que interactúan con los macrófagos alveolares para crear un ambiente antiinflamatorio.³²⁻³⁴ En estados inflamatorios, como en la infección, los neumocitos tipo I aumentan la expresión de receptores toll-like y los tipo II promueven la producción de surfactante pulmonar A y D.^{32,34} Esto favorece la opsonización y fagocitosis por unión a antígenos de *Coccidioides spp.* Interesantemente se ha descrito que este hongo también es capaz de regular a la baja la producción de estos surfactantes como mecanismo de escape inmunológico gracias a mediadores inflamatorios como IL-1 β y factor de necrosis tumoral α .³²⁻³⁴ Aunque estos receptores de reconocimiento de patrones se encuentran en diferentes células, las principales descripciones han sido hacia las células del sistema inmune. En nuestro ensayo, las células epiteliales (neumocitos) pudieran jugar un papel importante en la falta de interacción con el inóculo. A pesar de la presencia de receptores de reconocimiento de patrones y demás proteínas, de acuerdo a la literatura, estas pudieran ser diferentes a las involucradas en las infecciones con bacterias previamente analizadas con PCLS. Cómo esta relación entre las artroconidias, los macrófagos y células epiteliales de nuestro ensayo resultó ser muy limitada requerirá de futuros ensayos.

CONCLUSIONES

Los subcultivos han sido usados como método de atenuación de la virulencia de diversos patógenos, principalmente bacterias y algunos hongos. Basados en la patogenia de *Coccidioides immitis* se evaluaron dos métodos para estudiar los cambios obtenidos tras 180 pases seriales en la forma micelial. El primero, la evaluación de la producción de esférulas en medio RPMI 1640-sph, mostró una diferencia en la concentración de esférulas entre la cepa parental y la cepa subcultivada que persistió por 6 días. Este cambio en la adaptación morfológica pudiera representar una atenuación del patógeno por falta de adaptación a los tejidos en su forma parasitaria. El segundo, la evaluación del proceso infeccioso en rebanadas de pulmón cortadas con precisión, demostró un mayor infiltrado inflamatorio polimorfo y acúmulos de macrófagos tras la exposición al inóculo, sin embargo no existieron diferencias entre la cepa parental y cepa subcultivada. Escasas arthroconidias y esférulas fueron observadas independientemente del tiempo de incubación y la cepa utilizada. Nuevos ensayos se requerirán para establecer un protocolo de infección en las rebanadas de pulmón de hámster, pensando en las características del animal usado, el tamaño del inóculo, tiempo de incubación y medio de cultivo. Los resultados en RPMI-sph resultan prometedores como medio de cultivo para la fase parasitaria y una futura evaluación de los genes expresados en cada cepa brindaría mayor información del grado de alteraciones genotípicas experimentadas. Al comprobarse la atenuación con pasajes seriales, podrían utilizarse los subcultivos como base para el desarrollo de medidas preventivas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Akram SM, Koirala J. Coccidioidomycosis. [Updated 2023 Feb 25]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448161/>
2. Ashraf, N., Kubat, R. C., Poplin, V., Adenis, A. A., Denning, D. W., Wright, L., McCotter, O., Schwartz, I. S., Jackson, B. R., Chiller, T., & Bahr, N. C. (2020). Re-drawing the Maps for Endemic Mycoses. *Mycopathologia*, 185(5), 843–865. <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00431-2>
3. Bays DJ, Thompson GR 3rd. Coccidioidomycosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2021 Jun;35(2):453-469. doi: 10.1016/j.idc.2021.03.010. PMID: 34016286.
4. CDC. Estadísticas para la fiebre del valle (coccidioidomycosis). Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED), Enero 2019, <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/coccidioidomycosis/spanish/statistics.html>
5. Arenas Guzmán, R. (2014). Capítulo 16. Micosis profundas, Coccidioidomycosis. *Micología Médica Ilustrada*. Quinta Edición. Editorial Mc Graw Hill Education.
6. Baptista, R., Riquelme, M. (2007). Epidemiología de la coccidioidomycosis en México. *Rev Iberoam Micol*, 24, 100-105
7. Teixeira, M. M., & Barker, B. M. (2017). Coccidioides and Coccidioidomycosis. *Current Progress in Medical Mycology*, 255–280. Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-64113-3_8
8. Saubolle MA, McKellar PP, Sussland D. Epidemiologic, clinical, and diagnostic aspects of coccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 2007;45(1):26-30.
9. Reyna-Rodríguez IL, Ocampo-Candiani J, Chavez-Alvarez S. Primary Cutaneous Coccidioidomycosis: An Update. *Am J Clin Dermatol*. 2020

- Oct;21(5):681-696. doi: 10.1007/s40257-020-00525-z. PMID: 32557380.
10. Bonifaz Trujillo, J. A. (2015). Capítulo 19. Coccidioidomycosis. *Micología básica médica*. Quinta Edición. Editorial Mc Graw Hill Education.
 11. Kollath DR, Miller KJ, Barker BM. The mysterious desert dwellers: *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*, causative fungal agents of coccidioidomycosis. *Virulence*. 2019 Dec;10(1):222-233.
 12. Etymologia: *Coccidioides*. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(6):1033.
 13. Kirkland TN, Fierer J. *Coccidioides immitis* and *posadasii*; A review of their biology, genomics, pathogenesis, and host immunity. *Virulence*. 2018;9(1):1426-1435.
 14. Xue J, Chen X, Selby D, Hung CY, Yu JJ, Cole GT. A genetically engineered live attenuated vaccine of *Coccidioides posadasii* protects BALB/c mice against coccidioidomycosis. *Infect Immun*. 2009 Aug;77(8):3196-208. doi: 10.1128/IAI.00459-09.
 15. Ahmad, I., Owais, M., Shahid, M., Aquil, F. (2010). Chapter 2. Combating fungal infections. Editorial Springer-Verlag.
 16. Petkus AF, Baum LL, Ellis RB, Stern M, Danley DL. Pure spherules of *Coccidioides immitis* in continuous culture. *J Clin Microbiol*. 1985 Aug;22(2):165-7. doi: 10.1128/jcm.22.2.165-167.1985.
 17. Converse JL. Effect of surface active agents on endosporulation of *Coccidioides immitis* in a chemically defined medium. *J Bacteriol*. 1957;74(1):106-107. doi:10.1128/jb.74.1.106-107.1957
 18. Mead HL, Van Dyke MCC, Barker BM. Proper Care and Feeding of *Coccidioides*: A Laboratorian's Guide to Cultivating the Dimorphic Stages of *C. immitis* and *C. posadasii*. *Curr Protoc Microbiol*. 2020 Sep;58(1):e113. doi: 10.1002/cpmc.113.
 19. Clemons KV, Capilla J, Stevens DA. Experimental animal models of coccidioidomycosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Sep;1111:208-24. doi: 10.1196/annals.1406.029.
 20. Finkelievich JL, Iovannitti C, Negrone R, Elías Costa MR. Experimental coccidioidomycosis in hamsters. Disease kinetics and death curve in

- relation to infective dose. *Mycoses*. 2000 Oct;43(9-10):333-8. doi: 10.1046/j.1439-0507.2000.00561.x.
21. Molina-Torres CA, Flores-Castillo ON, Carranza-Torres IE, et al. Ex vivo infection of murine precision-cut lung tissue slices with *Mycobacterium abscessus*: a model to study antimycobacterial agents. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2020;19(1):52. Published 2020 Nov 22. doi:10.1186/s12941-020-00399-3
22. Alsafadi HN, Uhl FE, Pineda RH, Bailey KE, Rojas M, Wagner DE, Königshoff M. Applications and Approaches for Three-Dimensional Precision-Cut Lung Slices. *Disease Modeling and Drug Discovery. Am J Respir Cell Mol Biol*. 2020 Jun;62(6):681-691. doi: 10.1165/rcmb.2019-0276TR.
23. Carranza-Rosales P, Carranza-Torres IE, Guzmán-Delgado NE, Lozano-Garza G, Villarreal-Treviño L, Molina-Torres C, Villarreal JV, Vera-Cabrera L, Castro-Garza J. Modeling tuberculosis pathogenesis through ex vivo lung tissue infection. *Tuberculosis (Edinb)*. 2017 Dec;107:126-132. doi: 10.1016/j.tube.2017.09.002.
24. Liu J, Tran V, Leung AS, Alexander DC, Zhu B. BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Hum Vaccin*. 2009;5(2):70-78. doi:10.4161/hv.5.2.7210
25. Molina-Torres CA, Castro-Garza J, Ocampo-Candiani J, Monot M, Cole ST, Vera-Cabrera L. Effect of serial subculturing on the genetic composition and cytotoxic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol*. 2010 Apr;59(Pt 4):384-391. doi: 10.1099/jmm.0.015966-0.
26. Almaguer-Chávez JA, Welsh O, Lozano-Garza HG, Said-Fernández S, Romero-Díaz VJ, Ocampo-Candiani J, Vera-Cabrera L. Decrease of virulence for BALB/c mice produced by continuous subculturing of *Nocardia brasiliensis*. *BMC Infect Dis*. 2011 Oct 26;11:290. doi: 10.1186/1471-2334-11-290
27. Gonzalez-Carrillo, C., Millan-Sauceda, C., Lozano-Garza, H. G., Ortiz-Lopez, R., Elizondo-Gonzalez, R., Welsh, O., Ocampo-Candiani, J., &

- Vera-Cabrera, L. (2016). Genomic Changes Associated with the Loss of *Nocardia brasiliensis* Virulence in Mice after 200 In Vitro Passages. *Infection and immunity*, 84(9), 2595–2606. <https://doi.org/10.1128/IAI.00329-16>
28. Chang, T. H., Lin, Y. H., Wan, Y. L., Chen, K. S., Huang, J. W., & Chang, P. L. (2020). Degenerated Virulence and Irregular Development of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* Induced by Successive Subculture. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 6(4), 382. <https://doi.org/10.3390/jof6040382>
29. Wing N., Burgess L.W., Bryden W.L. Cultural degeneration in two *Fusarium* species and its effects on toxigenicity and cultural morphology. *Mycol. Res.* 1995;99:615–620. doi: 10.1016/S0953-7562(09)80721-1
30. Martínez Moreno, Adrián. (2021). Análisis de virulencia de una cepa de *Coccidioides immitis* sometida a subcultivo. Tesis de especialista en Dermatología. Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”. Universidad Autónoma de Nuevo León.
31. Crossen AJ, Ward RA, Reedy JL, Surve MV, Klein BS, Rajagopal J, Vyas JM. Human Airway Epithelium Responses to Invasive Fungal Infections: A Critical Partner in Innate Immunity. *J Fungi (Basel)*. 2022 Dec 27;9(1):40. doi: 10.3390/jof9010040.
32. Ward, R. A., Thompson, G. R., 3rd, Villani, A. C., Li, B., Mansour, M. K., Wuethrich, M., Tam, J. M., Klein, B. S., & Vyas, J. M. (2021). The Known Unknowns of the Immune Response to *Coccidioides*. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(5), 377. <https://doi.org/10.3390/jof7050377>
33. Awasthi S, Magee DM, Coalson JJ. *Coccidioides posadasii* infection alters the expression of pulmonary surfactant proteins (SP)-A and SP-D. *Respir Res.* 2004 Dec 10;5(1):28. doi: 10.1186/1465-9921-5-28.
34. Diep, A. L., & Hoyer, K. K. (2020). Host Response to *Coccidioides* Infection: Fungal Immunity. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 581101.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Mi nombre es Adalberto Santana Gutiérrez, nacido el 9 de abril de 1995 en San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. Mis padres, la Doctora en Ciencias Agrícolas, Adriana Gutiérrez Díez y el Ingeniero en Alimentos, Adalberto Santana Belmares. Mis dos hermanos, la médico veterinaria María Elena y el abogado Mario. Realicé mis estudios superiores en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León egresando en el 2012. Ingresé en la especialización en Dermatología en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” con fecha prevista de egreso en 2024. Mis campos de interés son las enfermedades cutáneas infecciosas, ampollosas y reaccionales.