

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS Y RESPUESTA AL
ESTRÉS OXIDATIVO EN UN MODELO MURINO DE INFECCIÓN POR
HONGOS ZIGOMICETOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA”**

POR

DR. HIRAM VILLANUEVA LOZANO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN MEDICINA**

OCTUBRE, 2025

"EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS Y RESPUESTA AL
ESTRÉS OXIDATIVO EN UN MODELO MURINO DE INFECCIÓN POR
HONGOS ZIGOMICETOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA"

Aprobación de tesis:

Dra. C. Gloria María González González
Director de Tesis

Dra. C. Rogelio de Jesús Treviño Rangel,
Co-Director de Tesis

Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco
Comisión de Tesis

Dr. C. Angel Andrade Torres
Comisión de Tesis

Dr. C. Miguel Ángel Becerril García
Comisión de Tesis

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

DEDICATORIA

A DIOS...quien nunca me abandona, quien me guía y quien en la noche oscura me susurra la esperanza de su gloria.

A mis padres, quienes con su amor construyeron mi vida, como los átomos construyen la materia. Soy gracias a ustedes. Los amo por siempre y su luz no me abandona.

A mi esposo, mi compañero y cómplice, mi reto y mi recompensa. Tú y yo contra el mundo.

A mis hermanos mayores Iván y Denisse, ejemplo de nobleza, bondad y sacrificio, y a los que amo inconmensurablemente.

A mis sobrinos Rayito, Dieguito y Mía a quienes amo sólo por existir, pero sabiendo que en su vida yace el potencial de un Universo naciente.

A mis asesores de tesis y todos aquellos involucrados en la realización de este proyecto, gracias por su apoyo y guía.

*“Do not go gentle into that good night... rage, rage against the dying of
the light”*

-Dylan Thomas-

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Página
1. Resumen.	01
Capítulo II	
2. Introducción.	02
2.1 Antecedentes Históricos.	02
2.2 Epidemiología.	05
2.3 Cuadro Clínico.	08
2.4 Diagnóstico.	11
2.5 Tratamiento.	13
2.6 Respuesta Inmune a los Hongos.	16
Capítulo III	
3. Hipótesis	18
Capítulo IV	
4. Objetivos.	19
Capítulo V	
5. Material y Métodos	21
5.1 Lugar del Estudio.	21
5.2 Cepas Fúngicas	21
5.3 Diseño del Estudio.	23
5.4 Animales.	24
5.5 Modelos Murinos de Mucormicosis	25
5.6 Carga Fúngica.	27

5.7 Histopatología.	27
5.8 Citocinas	28
5.9 Estudio del Estrés Oxidativo	28
5.10 Análisis Estadístico.	29
Capítulo VI	
6. Resultados.	30
6.1 Modelo Murino de Infección por <i>R. oryzae</i>	31
6.2 Modelo Murino de Infección por <i>M. circinelloides</i>	33
6.3 Modelo Murino de Infección por <i>R. pusillus</i>	35
6.4 Modelo Murino de Infección por <i>L. corymbifera</i>	37
6.5 Modelo Murino de Infección por <i>S. racemosum</i>	39
6.6 Modelo Murino de Infección por <i>C. bertholletiae</i>	41
6.7 Estrés oxidativo.	43
6.8 Histopatología.	45
Capítulo VII	
7. Discusión.	48
Capítulo VIII	
8. Conclusión.	56
Capítulo IX	
9. Bibliografía.	57
Capítulo X	
10. Resumen Autobiográfico.	61

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Características diferenciales de zigomicetos	04
2. Cepas usadas en el estudio	23
3. Análisis Estadístico.....	25
4. Valores promedio de expresión de SOD	43
5. Valores promedio de expresión de GPX	45

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Incidencia de Zigomicosis	07
2. Manifestaciones Clínicas	10
3. Signo del Halo Reverso.....	12
4. Cartas del Equal Score	14
5. Respuesta Th1/Th17.....	17
6. Equipo de Alojamiento de los Animales de Laboratorio	25
7. Perfil de Citocinas <i>Rhizopus oryzae</i>	31
8. Carga Fúngica <i>Rhizopus oryzae</i>	32
9. Perfil de Citocinas <i>Mucor circinelloides</i>	33
10. Carga Fúngica <i>Mucor circinelloides</i>	34
11. Perfil de Citocinas <i>Rhizomucor pusillus</i>	35
12. Carga Fúngica <i>Rhizomucor pusillus</i>	36
13. Perfil de Citocinas <i>Lichtheimia corymbifera</i>	37
14. Carga Fúngica <i>Lichtheimia corymbifera</i>	38
15. Perfil de Citocinas <i>Syncephalastrum racemosum</i>	39
16. Carga Fúngica <i>Syncephalastrum racemosum</i>	40
17. Perfil de Citocinas <i>Cunninghamella bertholletiae</i>	41
18. Carga Fúngica <i>Cunninghamella bertholletiae</i>	42
19. Corte Histológico de Hígado	46
20. Corte Histológico de Riñón	47

LISTA DE ABREVIATURAS

Temp: Temperatura

Crec: Crecimiento

DM: Diabetes mellitus

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

GMS: Plata Metenamina de Gomori

PAS: Ácido periódico de Schiff

HyE: Hematoxilina y Eosina

AMB-L: Anfotericina B Liposomal

AMB-D: Anfotericina B Desoxicolato

AMB-CL: Anfotericina B Complejo Lipídico

PSC: Posaconazol

ISC: Isavuconazol

IL: Interleucina

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

IFN: Interferón

TNF: Factor de necrosis tumoral.

ITS: Internal Transcribed Spacer

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

PDA: Agar Papa-Dextrosa

GPX: Glutación Peroxidasa

SOD: Superóxido Dismutasa

CAPÍTULO 1

RESUMEN

Dr. Hiram Villanueva Lozano

Octubre, 2025.

Universidad Autónoma de Nuevo León, Hospital Universitario

Título: "Evaluación de la expresión de citocinas y respuesta al estrés oxidativo en un modelo murino de infección por hongos zigomicetos de importancia clínica"

Número de páginas: 65

Candidato al grado de Doctorado en Medicina

Área de Estudio: Infectología y Microbiología Clínica.

Justificación y Método de Estudio: La ocurrencia de las enfermedades producidas por hongos a nivel mundial se ha incrementado en las últimas décadas. Los zigomicetos son un grupo de hongos patógenos de gran importancia, esto a consecuencia de su alta mortalidad, complicado tratamiento y al rápido aumento en casos en los últimos años. El abordaje de las mucormicosis (enfermedad ocasionada por hongos zigomicetos) se basa en una combinación de tratamiento médico y quirúrgico sin embargo, a pesar de esto la mortalidad suele ser mayor al 50%. Se conoce que la respuesta inmune innata, tales como neutrófilos, monocitos/macrófagos, células dendríticas, expresión de citocinas y los mecanismos de estrés oxidativo juegan un papel primario en la defensa a la invasión e infección de este grupo de hongos. La evaluación y comprensión de la respuesta pro-inflamatoria y reguladora, es esencial para entender esta enfermedad y dilucidar nuevas estrategias para el abordaje de esta enfermedad. **Objetivo:** Evaluar el perfil de citocinas mediante la medición de su expresión en sangre y la respuesta al estrés oxidativo en órganos seleccionados en múltiples modelos murinos de infección sistémica por hongos zigomicetos de relevancia clínica.

Resultados: En el estudio estadístico final encontramos que aunque existe variabilidad en los diferentes modelos de infección y en las diferentes citocinas, en todos hubo elevación significativa de las mismas durante distintos tiempo de la infección, sin embargo existieron diferencias entre los diversos modelos y el grupo control y se encontró una correlación de Spearman predominantemente inversa entre la expresión de citocinas y la carga fúngica, lo cual demuestra la importancia de estas en el control de la infección. **Conclusiones:** Todos los modelos presentaron ante la infección sistémica con zigomicetos una elevación notable y significativa de citocinas sin embargo, la cantidad y tiempo en el que aparecen estas citocinas durante la evolución de la enfermedad pudieran marcar la diferencia entre la resolución de la infección y el desenlace en fatalidad, por lo que la relación entre las citocinas pro-inflamatorias y aquellas reguladoras pareciera ser de vital importancia.

CAPÍTULO 2

INTRODUCCIÓN

2.1 Antecedentes Históricos

Las enfermedades producidas por hongos han presentado un rápido incremento nivel global en las últimas décadas, entre otras razones debido a un mayor número de personas susceptibles tales como: pacientes con VIH, post trasplantados de órgano sólido o células hematopoyéticas, pacientes que reciben inmunomoduladores, pacientes con cáncer, prematuros, ancianos, etc. El aumento en el número de vuelos internacionales y el cambio climático son otras razones que pudieran haber afectado la incidencia y distribución de estos agentes patógenos (Vallabhaneni et al., 2016). Aún de mayor alarma es la creciente aparición de estas infecciones en pacientes inmunocompetentes sin factores de riesgo aparentes y en quienes al no sospecharse la infección por estos microorganismos, el diagnóstico suele ser tardío y el desenlace fatal (Gupta & Knapik, 2010; Lui et al., 2006; Sridhara et al., 2005).

Entre las infecciones fúngicas invasivas ocasionadas por hongos levaduriformes, *Candida* spp. y *Cryptococcus* spp. son los organismos más reconocidos. Entre los hongos filamentosos, *Aspergillus* spp. y los zigomicetos son los que más comúnmente han sido asociados a enfermedad. Este último

grupo es de gran relevancia debido a su alta mortalidad, difícil tratamiento y a que actualmente se ha presentado un incremento notable en su incidencia en parte debido al uso de antifúngicos de amplio espectro con poca o nula actividad contra este grupo de hongos (Chayakulkeeree et al., 2006; Oren & Paul, 2014).

El término zigomicosis se usa para describir a las infecciones fúngicas ocasionadas por hongos del grupo de los zigomicetos. Este grupo se encuentra formado por hongos filamentosos normalmente aseptados o pauciseptados, de hifas gruesas, hialinas y ramificadas. Tienen la habilidad de asimilar carbohidratos, crecen a temperaturas mayores de 37°C y se reproducen sexualmente mediante la formación de zigosporas. En el laboratorio su identificación macroscópica se basa en su rápido crecimiento y su morfología colonial caracterizada por un crecimiento algodonoso, que rápidamente ocupa toda la placa de cultivo y que puede variar de una coloración blanca a grisáceo oscura. Con respecto a sus características microscópicas, estas varían según la especie (Tabla 1). Este conjunto de hongos se ha reclasificado con base en las nuevas herramientas moleculares y, actualmente, engloba a dos grupos de hongos patogénicos: mucorales y entomophtorales. En la clínica, el término mucormicosis se usa para describir el espectro de infecciones agudas y subagudas ocasionadas por los hongos angioinvasivos del orden de los mucorales (Chayakulkeeree et al., 2006; Farmakiotis & Kontoyiannis, 2016; Lass - Flörl, 2009).

Especie	Temp. Crec.	Esporangióforo	Apófisis	Columela	Esporangio	Rizoides
<i>Lichtheimia</i> sp.	37	Ramificado, hialino	Cónica	Forma de domo	Forma de pera	Raro
<i>Apophysomyces</i> sp.	24-42	No ramificado, café	En forma de campana	Elongada	Forma de pera	basolaterales
<i>Mucor</i> sp.	<37	Ramificado, no ramificado, hialino	---	Esférica	Esférico	Ausente
<i>Rhizomucor</i> sp.	20-60	Ramificado, café	---	Esférica	Esférico	Raro
<i>Rhizopus</i> sp.	37	No ramificado, café	No prominente	Esférica	Esférico	Abundante

Tabla 1. Características diferenciales de algunos zigomicetos de importancia clínica. (Adaptado de Clin Microbiol Infect 2009; 15 (Supl. 5): 60–65)

2.2 Epidemiología

Los mucorales son hongos medioambientales ubicuos que proliferan en la materia en descomposición como lo es la composta, alimentos caducos o excretas animales, por lo que brotes de esta enfermedad han sido asociados a desastres naturales (tornados, terremotos, inundaciones, etc.). La donación de órganos sólidos provenientes de pacientes que han fallecido por ahogamiento se ha descrito como factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad ocasionada por estos patógenos. El estudio epidemiológico más grande de mucormicosis describe todos los casos reportados en la literatura de 1885 a 1999, encontrando a *Rhizopus* spp. como el agente causal más frecuente de esta enfermedad (47%), seguido por *Mucor* spp. (18%), *Cunninghamella* spp (7%), *Apophysomyces elegans* (5%), *Lichtheimia* spp. (5%), *Saksenaea* spp. (5%) y *Rhizomucor* spp. (4%). De estos pacientes estudiados, un 80% tenían un factor de riesgo predisponente entre ellos y en orden de frecuencia mencionamos los más comunes: diabetes mellitus (DM), malignidad, trasplante de órgano sólido, uso de deferoxamina, uso de drogas intravenosas, trasplante de médula ósea, falla renal, bajo peso al nacer, diarrea, malnutrición, VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) y lupus eritematoso sistémico. Los sitios más frecuentes de afección que han sido descritos incluyen: senos paranasales (39%), pulmones (24%), piel (19%), cerebro (9%), tracto gastrointestinal (7%) y enfermedad diseminada (3%). Estudios recientes han demostrado una incidencia creciente de mucormicosis por *Lichtheimia* spp., colocándola en tercer lugar en frecuencia y al pulmón como sitio

de afección más descrito (Enoch et al., 2017; Roden et al., 2005; Vallabhaneni et al., 2016).

La epidemiología de esta enfermedad es cambiante ya que de asociarse casi exclusivamente a personas con diabetes mellitus hace tan sólo unas décadas, hoy en día se encuentra cada vez descrito con mayor frecuencia en personas con malignidades hematológicas y post-trasplantados de células hematopoyéticas, aunque en general ha aumentado su incidencia en todos los grupos de pacientes e incluso en aquellos sin condiciones subyacentes (Fig.1). Así mismo es notoria esta diferencia entre el mundo occidental y las regiones asiáticas, donde en esta última la DM es el principal factor de riesgo. La Diabetes ha sido reportada como factor de riesgo de gran importancia en la India donde el 57% de los pacientes con mucormicosis tienen diabetes descontrolada así mismo esto se ha reportado en Irán (74%) y México (72%), mientras que en los países europeos esta asociación solo se encuentra en el 17-29% de los afectados (Prakash & Chakrabarti, 2019; Roden et al., 2005) .

La tasa de mortalidad asociada a esta enfermedad varía según la presentación clínica y sitio afectado oscilando entre un 40 – 80% ,siendo menor en pacientes inmunocompetentes y mayor en aquellos con malignidades hematológicas o trasplante de células hematopoyéticas (Cornely et al., 2019a) .

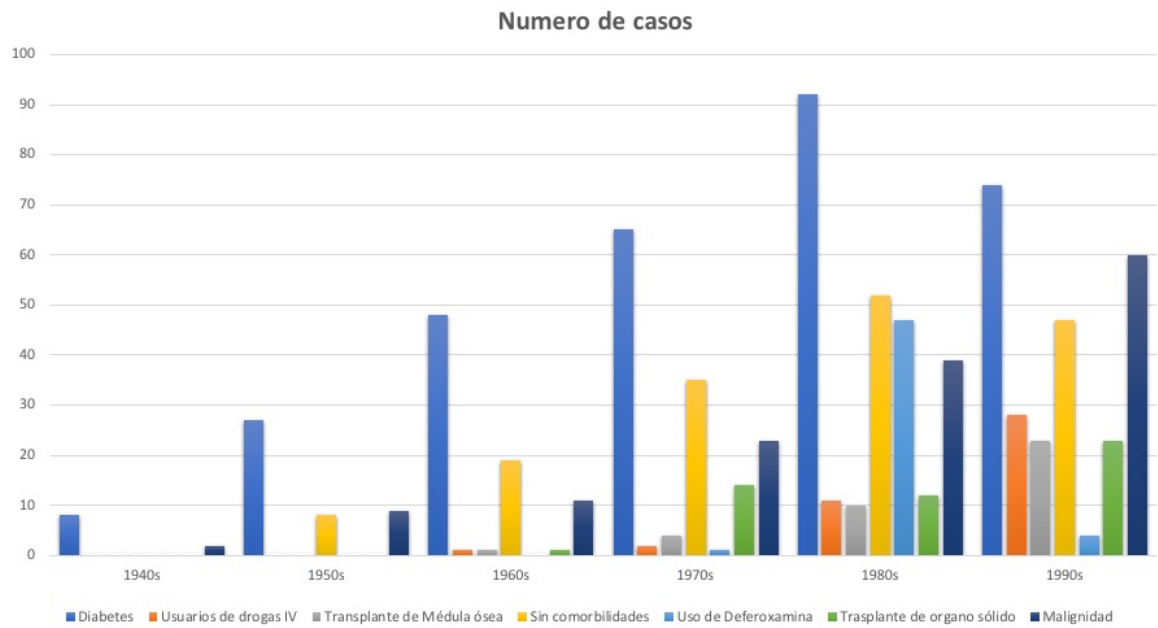


Fig. 1 Incidencia de zigomicosis en las últimas 6 décadas por tipo de población de riesgo en un análisis de 929 casos reportados en la literatura. (Adaptado de Roden et al, CID,2005)

2.3 Cuadro Clínico

La vía de entrada más común de los zigomicetos en el ser humano es a través de la inhalación de esporas, cuyo tamaño (3-11 μ m) les permite introducirse por la vía aérea y alojarse en los alvéolos distales, otra forma es a través de la inoculación directa a través de heridas en piel. En los casos de mucormicosis cutánea primaria, la inoculación de las esporas ocurre de forma subcutánea a través de heridas en la piel aún menores como mordeduras de insecto. La inhalación de inóculos muy grandes puede ocasionar enfermedad subaguda aún en huéspedes inmunocompetentes; sin embargo, para establecer una infección, estas esporas deben sobrevivir a la fagocitosis de macrófagos y neutrófilos para germinar en hifas angioinvasivas, por lo que pacientes con deficiencia de la migración y fagocitosis de polimorfonucleares presentan una enfermedad progresiva más rápida y de mayor mortalidad. La relación entre sobrecarga de hierro y mucormicosis es de especial interés, ya que diversos tipos de hongos adquieren hierro del huésped a través del uso de sideróforos o permeasas de hierro de gran afinidad sin embargo, en los mamíferos el hierro está fuertemente unido a la transferrina y existe poca disponibilidad del mismo para los microorganismos invasores, la cetoacidosis diabética incrementa el hierro libre debido a la reducción en pH, lo que fomenta la asociación con la mucormicosis. (Farmakiotis & Kontoyiannis, 2016; Pozo et al., 2014; Sridhara et al., 2005).

La manifestación más característica de la mucormicosis es la necrosis del tejido afectado, la cual resulta de la angioinvasión y posterior trombosis. Basado en el sitio anatómico afectado y su presentación clínica, esta afección se clasifica en alguna de las siguientes seis formas clínicas: rinocerebral (sinusitis), pulmonar, cutánea, gastrointestinal, diseminada y otras menos comunes como endocarditis, osteomielitis, peritonitis, etc. (Fig.2). La sinusitis ocurre más comúnmente en pacientes con diabetes descontrolada y suele ocurrir afección por continuidad hacia la órbita ocular, meninges y encéfalo. Las afecciones pulmonares son asociadas más frecuentemente a pacientes con malignidades hematológicas y se presenta clínicamente similar a la neumonía invasiva por *Aspergillus* spp. pero puede diferir en sus signos radiológicos y acompañarse de hemoptisis masiva. (Cornely et al., 2019b; Farmakiotis & Kontoyiannis, 2016) (Petrikos et al., 2012)

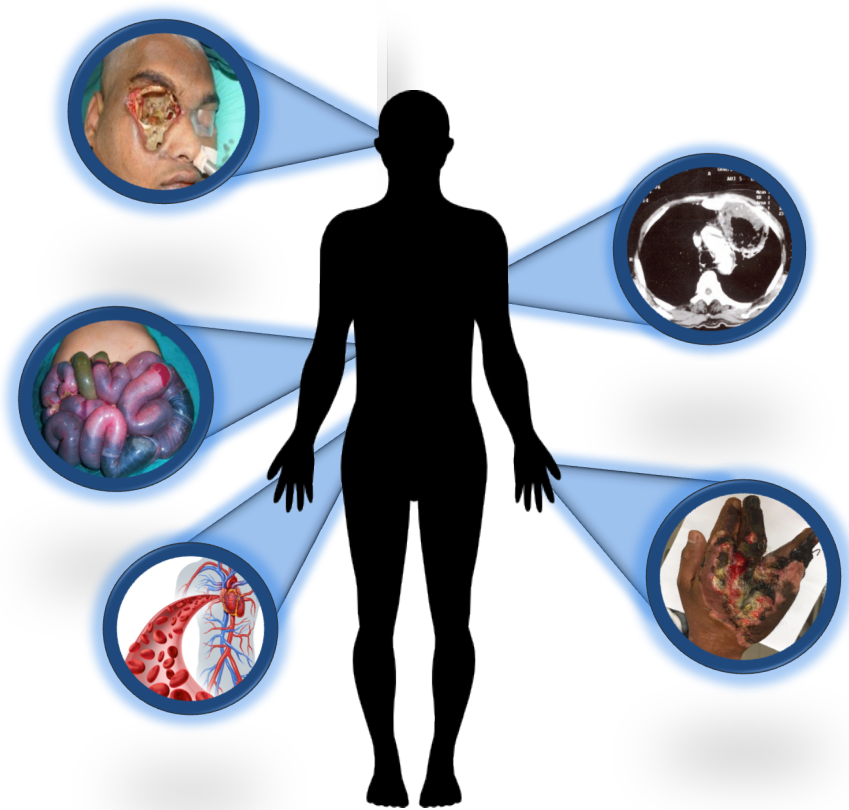


Fig. 2 - Manifestaciones clínicas asociadas al sitio de lesión y/o entrada ocasionadas por hongos zigomicetos y englobadas en la entidad clínica conocida como mucormicosis.

2.4 Diagnóstico

Como muchas otras infecciones fúngicas el diagnóstico de mucormicosis es difícil y supeditado a la disponibilidad de estudios de imagen, laboratorio de micología, histopatología y sobre todo personal entrenado.

El uso de la tomografía axial computarizada para el diagnóstico de esta enfermedad es de gran ayuda ya que en sus diferentes manifestaciones clínicas podemos encontrar signos de la enfermedad tal como, lesiones en vidrio despulido rodeadas por área de consolidación en la mucormicosis pulmonar (Figura 3), sinusitis con destrucción ósea en la mucormicosis rino-orbital, y afección del parénquima cerebral (en este caso es mejor el uso de la Resonancia magnética) en caso de mucormicosis rino-orbito-cerebral. El diagnóstico histopatológico suele ser una de las herramientas más prácticas y precisas para esta enfermedad; sin embargo, las lesiones ocasionadas por estos agentes fúngicos, aunque características no son específicas, y puede en ocasiones confundirse con *Aspergillus* spp. A diferencia de otras micosis, los mucorales no suelen teñirse bien con plata metenamina de gomori (GMS) o ácido peryódico de Schiff (PAS), pero suele ser fácilmente visible en la tinción con Hematoxilina y Eosina (HyE). El cultivo independientemente del diagnóstico clínico se sugiere fuertemente para tener identificación de género y especie. Los marcadores serológicos como β -D-glucano y galactomanano pueden formar parte del diagnóstico al permitir descartar en caso de positividad al agente etiológico como

un zigomiceto o sospechar una infección fúngica mixta. (Cornely et al., 2019b; Farmakiotis & Kontoyiannis, 2016).

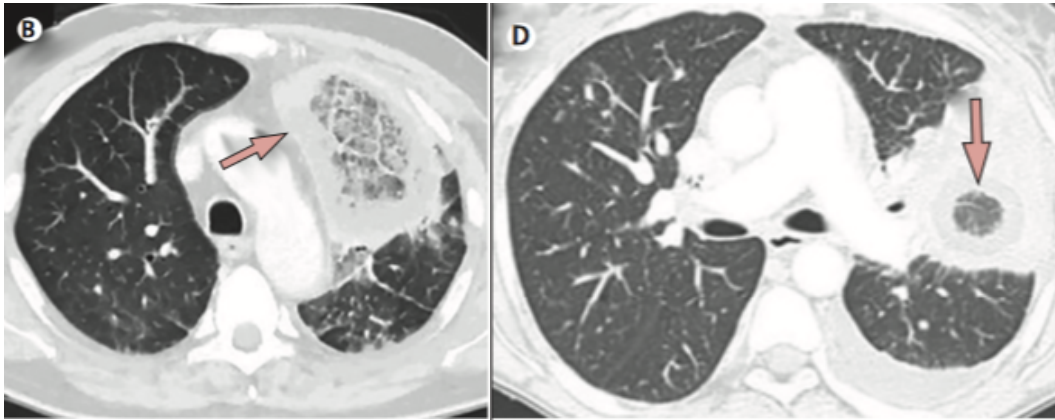


Fig. 3 – Signo del halo reverso en el cual se muestra un área en vidrio despolido rodeada de una consolidación. (Tomado y adaptado de Cornely *et al*, Lancet 2019)

2.5 Tratamiento

El abordaje de la mucormicosis se basa en una combinación de tratamiento médico y quirúrgico, especialmente en afección rinocerebral y pulmonar, limitando la diseminación agresiva de esta infección mediante la escisión quirúrgica del tejido afectado en combinación con tratamiento antifúngico temprano. El agente más activo y recomendado como de primera línea son las formulaciones lipídicas de la anfotericina B: anfotericina B liposomal (AMB-L) y anfotericina B complejo lipídico (AMB-CL). La dosis recomendada de AMB-L y AMBCL es de 5mg/kg pero dosis de hasta 10mg/kg se han estudiado, sin presentar beneficios aparentes excepto en afección a sistema nervioso central (SNC). Otros agentes útiles para el manejo clínico de esta enfermedad incluyen a la anfotericina B desoxicolato (AMB-D) y los nuevos azoles: posaconazol (PSC) e isavuconazol (ISC). Este último se ha recomendado también como alternativa de primera línea con una fuerza de la recomendación moderada, PSC sólo se recomienda como terapia de salvamento ante la falla al tratamiento o debido a la intolerancia a los compuestos de primera línea y de preferencia en su presentación de tabletas de liberación prolongada por sobre la formulación en solución oral que suele tener menos biodisponibilidad. En estudios de eficacia terapéutica en ratones el uso de combinaciones específicas de antifúngicos han mostrado mejorar la supervivencia sin mostrar antagonismo. A pesar de las nuevas opciones existentes y del uso de terapia combinada, que ha mostrado resultados contradictorios en ensayos clínicos aunque promisorios en algunos casos, especialmente el uso de AMB-L más equinocandinas o AMB-L más

EQUAL Mucormycosis Score 2018

Derived From Current Guidelines to Measure QUALITY of Mucormycosis Management

Cornely OA^{1,2}, Köhler B^{1,2}, Mellinger SC^{1,2}

¹ Department I for Internal Medicine, Excellence Center for Medical Mycology (ECMM), University of Cologne, Germany ² ECAD Cluster of Excellence, University of Cologne, Germany

DOI: 10.4126/FRL01-006411740



Background

The EQUAL Mucormycosis Score 2018 weighs and aggregates factors for ideal management of mucormycosis. EQUAL Scores reflect the strongest recommendations from current guidelines. The Score Cards are a quick reference to measure guideline adherence and to support antifungal stewardship.

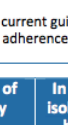
Maximum Score	In case of isolate	In case of biopsy	In case of isolate and biopsy	
Diagnosis	11	13	16	18
Treatment		8		
Follow-up		6		
Total	25	27	30	32

References

1. Cornely et al. *Clin Microbiol Infect* 2014; 2. Tacke et al. *Mycoses* 2014; 3. Koehler et al. *Infect Dis Clin N Am* 2015; 4. Tissot et al. *Haematol* 2017.



UNIKLINIK
KÖLN



ECMM
Center of Excellence in Clinical and Laboratory Mycology and Clinical Social Mycology

December 2018

Fig. 4 - Cartas del EQUAL SCORE para valorar el apego al tratamiento según guías internacionales.

En pacientes con cáncer que presentan mucormicosis y que reciben profilaxis con voriconazol la mortalidad es mayor de la media global, alcanzando aproximadamente un 73% (Kim et al., 2017). En algunos estudios en modelos animales se encontró que el uso de voriconazol parece favorecer una mayor virulencia en la enfermedad por hongos del orden mucorales (Lewis et al., 2011). A esto se adjuntan otros problemas como una susceptibilidad variable a la anfotericina B y resistencia a la mayoría de los otros antifúngicos. Hasta el momento, no se dispone de una prueba rápida, sensible y específica que permita establecer con certeza el diagnóstico de mucormicosis. Los marcadores antigénicos empleados de manera rutinaria en el diagnóstico de otras micosis invasivas, como el β -D-glucano y el galactomanano, carecen de valor diagnóstico y presentan una utilidad limitada para la detección de esta infección. Debido a lo anterior se sigue dependiendo del cultivo tradicional y la histopatología para el diagnóstico de esta infección, siendo el primero poco sensible al recuperarse de muestra clínica y el segundo dependiente de la habilidad del patólogo que lo interpreta. Todo lo anterior evita el tratamiento y abordaje oportunos, lo cual contribuye en parte, al mal pronóstico asociado a esta devastadora enfermedad (Farmakiotis & Kontoyiannis, 2016; Katragkou et al., 2014; Kontoyiannis et al., 2005; Lewis et al., 2011).

2.6 Respuesta inmune a la infección por hongos mucorales.

Se conoce por estudios *in vitro* e *in vivo* que la respuesta inmune innata, tales como neutrófilos, monocitos/macrófagos, células dendríticas y los mecanismos de estrés oxidativo tienen una función significativa en la defensa a la invasión y diseminación de este grupo de hongos. Sin embargo, el papel de la inmunidad adaptativa aún es pobremente entendido. Esfuerzos recientes en el tratamiento de ésta y otras infecciones fúngicas se han enfocado en entender mejor los mecanismos inmunológicos involucrados en la defensa ante esta enfermedad, con la finalidad de desarrollar estrategias terapéuticas que favorezcan el combate a estos agentes. Algunos ejemplos de estudios que han incluido la modulación terapéutica inmunológica como tratamiento incluyen: el uso de las citocinas GM-CSF e IFN- γ solas o en combinación con antifúngicos convencionales (Roilides et al., 2014; Saoulidis et al., 2011; Spellberg & Ibrahim, 2010), linfocitos T citotóxicos modificados específicos para hongos (células CAR-T⁺) (Kumaresan et al., 2014), anticuerpos anti-CoH (proteínas de los mucorales involucradas en la invasión) (Gebremariam et al., 2014) y reducción de la hipoxia e inflamación mediante el bloqueo de IL-1 (Gresnigt et al., 2016).

Varias líneas de evidencia sugieren que mantener la auto tolerancia tiene la misma importancia que proporcionar resistencia a los patógenos en la inmunidad.

Mientras que algunas inmunodeficiencias primarias se caracterizan por la desregulación de las funciones tolerogénicas, otras inmunodeficiencias presentan respuestas inflamatorias o de resistencia alteradas (p. ej., en el desarrollo o función de T_H17) y la aparición concomitante de infecciones fúngicas. Las estrategias terapéuticas orientadas a potenciar la respuesta inmunitaria del huésped frente a los patógenos fúngicos mediante el uso de GM-CSF e IFN- γ se fundamentan en la evidencia de que los neutrófilos desempeñan un papel crucial en la defensa contra infecciones por *Candida* y *Aspergillus*, mientras que las respuestas mediadas por linfocitos T cooperadores de los subtipos Th1 y Th17 son esenciales para la inmunidad adaptativa frente a estos hongos. (Figura 5) (Armstrong-James et al., 2017) .

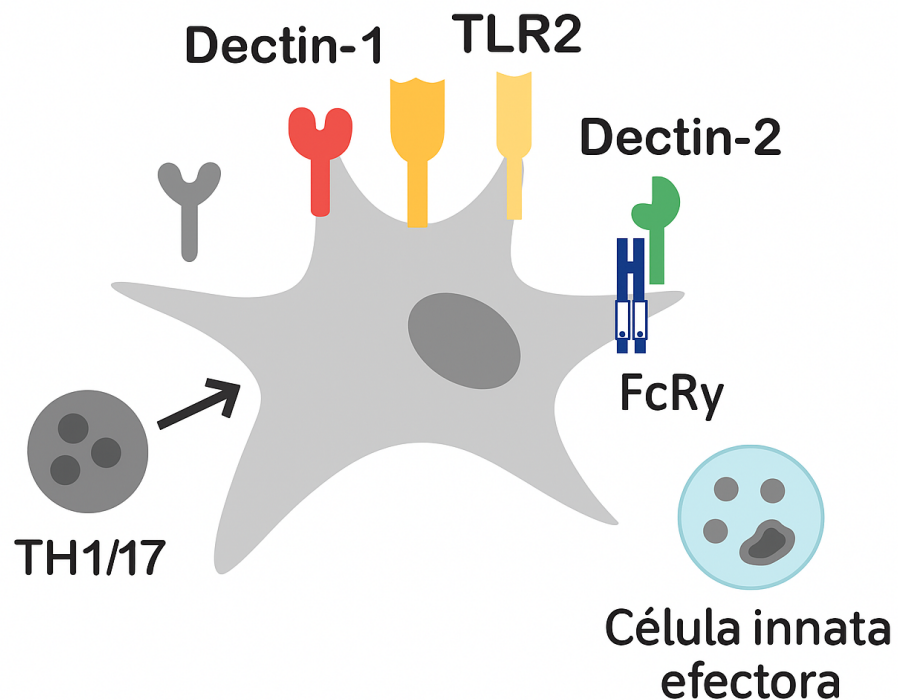


Fig. 5 Respuesta T_H1 / T_H17 adaptativa y activación de células innatas efectoras (Adaptado de Drummond RA, BSI, Aberdeen, U.K. Poster)

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS

La infección experimental por hongos zigomicetos induce respuestas inmunes particulares en la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-17A, IFN- γ y TNF- α) y anti-inflamatorias (IL-10), así como en la respuesta al estrés oxidativo entre las diferentes especies y en comparación con el grupo control no infectado.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-17A, IFN- γ y TNF- α) y anti-inflamatorias (IL-10) en suero y la respuesta al estrés oxidativo en bazo, riñón e hígado en modelos murinos de infección sistémica por hongos zigomicetos.

4.2 Objetivos Específicos

- 1.- Identificar y caracterizar cepas de hongos zigomicetos de importancia clínica por métodos fenotípicos y moleculares.
- 2.- Estandarizar un modelo murino de mucormicosis diseminada para cada uno de los géneros de relevancia clínica (*Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Lichtheimia* spp., *Rhizomucor* spp., *Cunninghamella* spp., *Apophysomyces* spp, *Saksenaea* spp. y *Syncephalastrum* spp.).
- 3.- Cuantificar la producción de las citocinas: IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ y TNF- α en muestras de suero provenientes de los animales de experimentación.

4.- Determinar la producción de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en homogeneizados tisulares de bazo, riñón e hígado provenientes de los animales de experimentación.

CAPÍTULO 5

MATERIAL Y MÉTODOS

5. Material y Métodos

5.1 Lugar del Estudio

Este trabajo se llevó a cabo en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas y en el Laboratorio de Microbiología Experimental (registro SAGARPA-SENASICA AUT-B-B-0425-114) pertenecientes al Departamento de Microbiología en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

5.2 Cepas fúngicas

Los hongos zigomicetos utilizados en este trabajo fueron aislados y recolectados en el Departamento de Microbiología de la Universidad Autónoma de Nuevo León en México y se enlistan en la Tabla 2. Las cepas fueron identificadas con base en características morfológicas coloniales y microscópicas. Posteriormente, las especies fueron confirmadas por secuenciación génica de las regiones del ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), así como D1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y D2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'),

tras su amplificación y usando el método de Sanger en un secuenciador Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems). Los organismos se mantuvieron bajo ultracongelación a -80 °C en caldo de papa dextrosa con glicerol al 15% y se cultivaron en agar papa dextrosa (PDA) a 37 °C para su activación, se resembraron en una segunda ocasión para su activación metabólica previo a utilizarse en los diferentes modelos murinos.

Los ensayos de susceptibilidad antifúngica *in vitro* de las cepas identificadas se efectuaron utilizando el método de microdilución en caldo, acorde a los lineamientos estipulados en el documento M38-3era edición del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) de los Estados Unidos de América (Standard., 2017). Los fármacos probados en este trabajo fueron obtenidos de distribuidores autorizados por sus casas comerciales en forma de polvo puro grado analítico siendo los siguientes: Anfotericina B (bioWORLD, Dublin, Ohio, USA), Posaconazol (PSC; Merck, Rahway, NJ) e Itraconazol (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA). Las concentraciones finales de los fármacos fueron: 0.032 a 16 µg/mL, y se realizaron diluciones seriadas en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Corning, NY, USA). La concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como la concentración más baja del fármaco que no presentó crecimiento del organismo ensayado a la examinación visual mediante espejo invertido. Para el control de calidad se emplearon las siguientes cepas: *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Paecilomyces variotii* MYA 3630.

Especie	Código cepa	No. de acceso de		Sitio de origen
		GenBank		
		ITS	D1/D2	
<i>Rhizopus oryzae</i>	172751	MK174988	MK796452	Lavado broncoalveolar
<i>Mucor circinelloides</i>	HGM-Z28	MK174983	MK174982	Tejido nasal
<i>Rhizomucor pusillus</i>	ATCC 46342	NR_111462		
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	99975	MK841578	MK841572	Herida mano
<i>Saksenaea vasiformis</i>	182885	MK841580	MK841574	Biopsia mucosa oral
<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	Delf2017	MK841581	MK841575	Espiráculo (delfín)
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	HGM-Z19	MK841579	MK841573	Tejido nasal
<i>Apophysomices trapeziformis</i>	ABO613	MK841582	MK841576	Tejido nasal

Tabla 2. Cepas de hongos zigomicetos usadas en el estudio.

5.3 Diseño del estudio

Para calcular el número de ratones que se utilizaron en este trabajo nos basamos en estudios similares reportados en la literatura. Adicionalmente, se realizó con asesoría estadística el cálculo de tamaño de muestra con base en la estimación de la media en una población definida. Utilizando una desviación estándar (σ) de 2.4 y un poder estadístico del 99%, el resultado del cálculo del tamaño de la muestra fue de 180 murinos, 22 por grupo experimental (6 grupos y un grupo control de 4 ratones).

Se realizaron estudios previos para estandarizar la concentración óptima del inóculo fúngico para el desarrollo de cada infección. Una vez definido lo anterior, se formaron 6 distintos grupos experimentales con 6 animales por grupo, los cuales se infectaron por vía sistémica con los siguientes hongos zigomicetos: *R. oryzae*, *M. circinelloides*, *R. pusillus*, *L. corymbifera*, *C. bertholletiae* y *S. racemosum*.

5.4 Animales

Se utilizaron ratones BALB/c, machos (peso, 22-25 g; Harlan, México) en todos los experimentos. Los animales se alojaron en condiciones libres de patógenos en grupos de cinco animales dentro de jaulas aisladas y con un sistema de ventilación cerrado con filtros HEPA (Imagen 1) ubicado en una instalación autorizada a nivel nacional (SAGARPA-SENASICA AUT-B-B-1216-029). Se proporcionó agua destilada y alimento estériles para roedores *ad libitum* de la marca Purina®. Todos los procedimientos experimentales se realizaron acorde a la normativa mexicana para la experimentación animal (NOM-062-ZOO-1999). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación y el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina, U.A.N.L. con el número de registro: MB18-00006.



Figura 6.- Equipo de alojamiento ventilado de los animales de laboratorio.

5.5 Modelos murinos de mucormicosis

Los inóculos se prepararon en el mismo día en que se realizó cada infección para asegurar que fueran lo más precisos al cálculo realizado y que conservaran su viabilidad. Se colocaron 25-30 mL de solución salina estéril suplementada con Tween 80 al 0.1% de tal manera que el nivel de la solución sobrepasara el crecimiento de los cultivos en PDA de cinco a siete días de incubación. Las esporangiosporas se recolectaron raspando la superficie del agar con un aplicador estéril para separar las células fúngicas. Con una pipeta Pasteur se colectó el sobrenadante y se colocó en un tubo cónico de 50 mL, se procedió a realizar un ciclo de centrifugación y se desechó la mayoría del sobrenadante. A partir del precipitado y solución restante se realizó un filtrado a través de una

gasa estéril para eliminar grumos de esporangiosporas, hifas y fragmentos de agar. Las suspensiones resultantes se ajustaron a 1.5×10^6 esporangiosporas/mL basándose en los recuentos en hemocitómetro y se inocularon en serie en PDA para confirmar la viabilidad.

En cada modelo de mucormicosis se utilizó un total de 23 ratones, de los cuales en 18 se indujo la infección experimental y los 5 restantes permanecieron como el grupo control no infectado. Los animales a infectar fueron previamente y, de manera individual, colocados en un inyector de cola giratorio (Braintree Scientific Inc., EE. UU.) para enseguida inyectarles 0.2 mL del inóculo a través de la vena lateral. Los animales se monitorearon al menos dos veces al día para detectar el desarrollo de síntomas clínicos y se sacrificaron si cumplían los criterios de valoración predefinidos de enfermedad grave (pérdida de peso $\geq 25\%$, letargo severo, disnea grave, incapacidad para moverse de forma coordinada). Los días 1, 3 y 7 post-infección se seleccionaron aleatoriamente 6 ratones por día experimental, los cuales se anestesiaron por inhalación controlada de isofluorano al 5% (Boise, ID, EE.UU.) para extraer sangre por punción cardíaca y posteriormente se sacrificaron mediante dislocación cervical. Finalmente se practicaron necropsias donde se retiraron asépticamente los bazo, riñones y un lóbulo de los hígados de cada animal. Aproximadamente la mitad de cada órgano se trató acorde al estudio de carga fúngica y la otra mitad se reservó para estudio histopatológico.

5.6 Carga fúngica

Los órganos recolectados durante la necropsia animal se pesaron y colocaron en bolsas plásticas estériles Whirl-Pak (Fisher Scientific, EE. UU.). Los tejidos se homogeneizaron manualmente de forma suave en 2 mL de solución salina estéril suplementada con 0.4 mg/mL de cloranfenicol (Pisa, México) y 0.0025 mg/mL gentamicina (Pisa, México). Se hicieron alícuotas y se diluyeron en serie para cultivo cuantitativo en PDA. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 hasta 72 h. Se enumeraron las colonias fúngicas y finalmente se calcularon las unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de tejido analizado. Todo el material restante de los homogeneizados tisulares se almacenó a -80 °C para usarse posteriormente en el estudio de estrés oxidativo.

5.7 Histopatología

Para evaluar las alteraciones histopatológicas causadas por las infecciones fúngicas, los órganos a analizar se fijaron por inmersión en formalina tamponada neutra. A continuación, las muestras se deshidrataron, se dispusieron como histoarreglos y se incluyeron en bloques de parafina grado histológico. Se cortaron secciones de cinco micrómetros de grosor y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E), ácido periódico de Schiff (PAS) y plata metenamina Grocott-Gomori (GMS). Las preparaciones se examinaron mediante microscopía óptica.

5.8 Determinación de citocinas

Las muestras de sangre obtenidas mediante punción cardíaca en los animales de experimentación se recolectaron en tubos Microtainer (Becton Dickinson, EE. UU.) y se centrifugaron a 1,700 x *g* durante 10 min a 4 °C. El suero se separó y las muestras se fraccionaron inmediatamente en alícuotas y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Para comparar las respuestas inflamatorias murinas inducidas por los seis hongos zigomicetos evaluados, los niveles de interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interleucina-17A (IL- 17A), interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) se cuantificaron en suero mediante el kit Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Th17 6-Plex Panel A (Bio-Rad, M6000007NY) utilizando el Sistema Bio-Plex 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.), conforme a las instrucciones del fabricante.

5.9 Estudio del estrés oxidativo

Se descongelaron las muestras de homogeneizados tisulares previamente utilizadas en el estudio de carga fúngica y se sometieron a dos lavados con solución salina estéril con el objetivo de disminuir los eritrocitos presentes. Se tomaron alícuotas de 10 μ L para medir la actividad de glutatión peroxidasa (GPX) usando el kit comercial RANSEL (Randox[®]. Crumlin, Reino Unido), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La actividad de GPX se determinó mediante el uso de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm.

Para superóxido dismutasa (SOD) se usaron también alícuotas de 10 μ L, las cuales se procesaron empleando el kit comercial RANSOD (Randox[®]. Crumlin, Reino Unido). La actividad de SOD se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 505 nm.

5.10 Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos se expresan como la media $\pm$ error estándar (SE) y fueron analizados estadísticamente empleando el programa GraphPad Prism versión 6.01 (La Jolla. CA, EE. UU.). Se utilizó el método de comparación múltiple de Kruskal-Wallis corregido por el método de Dunn para analizar los niveles de citocinas. Así mismo, se realizó una correlación de Spearman para la comparación de los niveles de citocinas y carga fúngica en los órganos analizados. En la medición de estrés oxidativo se utilizó la prueba *t* de student para la comparación con el grupo control.

CAPITULO 6

6.1 Resultados

Se estudió el perfil de citocinas en suero después de la inoculación de las ocho especies de zigomicetos más comunes en un modelo murino de infección sistémica. En dos de los ocho agentes de mucormicosis (*A. trapeziformis* y *S. vasiformis*) no se consiguió la esporulación en cantidad suficiente para llevar a cabo la infección animal, a pesar de sembrar estos hongos en diversos medios especializados (agar Papa-dextrosa, agar agua, medio mínimo de esporulación y agar Czapek-dox) y bajo diversas condiciones (luz/oscuridad, diferentes temperaturas 35 °C a 40 °C y exposición a radiación ultravioleta), por lo que después de diversos intentos infructuosos para conseguir el inóculo adecuado para producir la infección se decidió descartar estos dos modelos de infección.

Todas las infecciones murinas (*R. oryzae*, *C. bertholletiae*, *M. circinelloides*, *R. pusillus*, *S. racemosum* y *L. corymbifera*) presentaron un rápido incremento de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, pero existen diferencias notables entre los perfiles de expresión de las diferentes especies de hongos zigomicetos a lo largo del curso de la infección y su relación con la carga fúngica encontrada en los órganos recolectados, así como en comparación con el grupo no infectado (control). Lo cual se presenta a continuación.

6.2 Modelo murino de infección por *Rhizopus oryzae*

En el modelo murino de infección sistémica por *R. oryzae*, las citocinas proinflamatorias como IL-1 β e IFN- γ mostraron una elevación rápida y estadísticamente significativa en comparación con los ratones control, lo cual se relacionó con una disminución de la carga fúngica en el riñón y el bazo, pero IL-17 no presentó un aumento significativo en el día 1. Posteriormente, en el séptimo día postinoculación, se observa una expresión más marcada de las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-17A (Figura 6) con una disminución de la carga fúngica en riñón e hígado pero un aumento en bazo (Figura 7), presentando una correlación positiva de Spearman entre la expresión de citocinas y la carga fúngica en bazo.

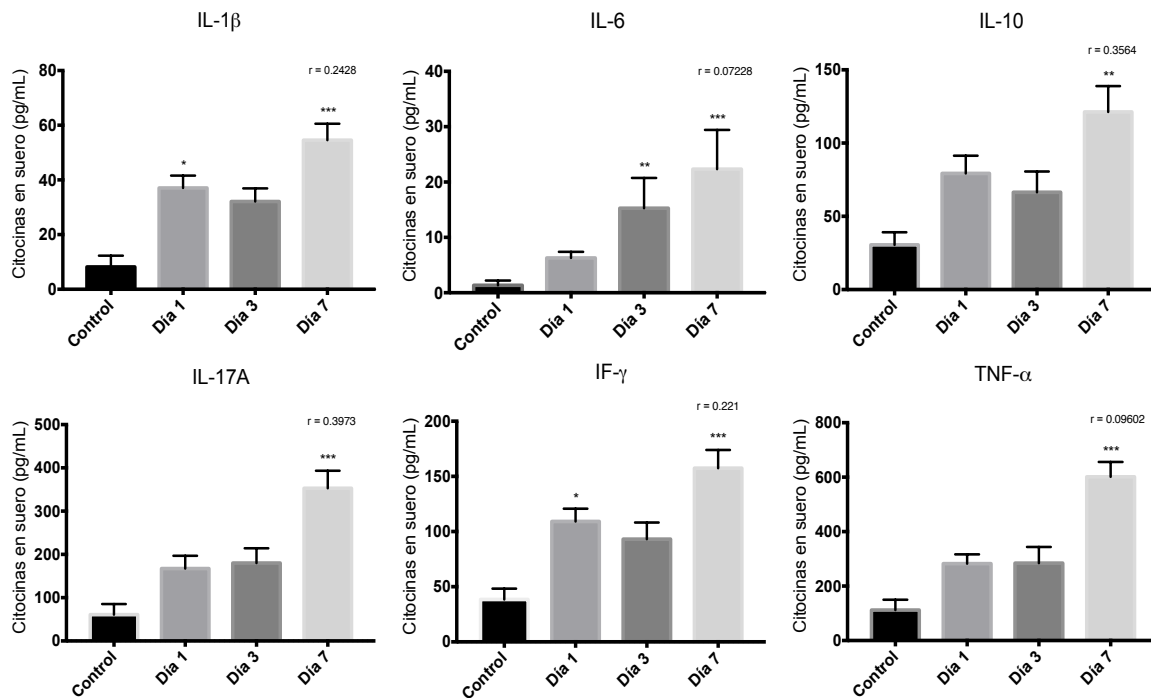


Fig.7 - Perfil de citocinas en el modelo de infección sistémica por *R. oryzae*

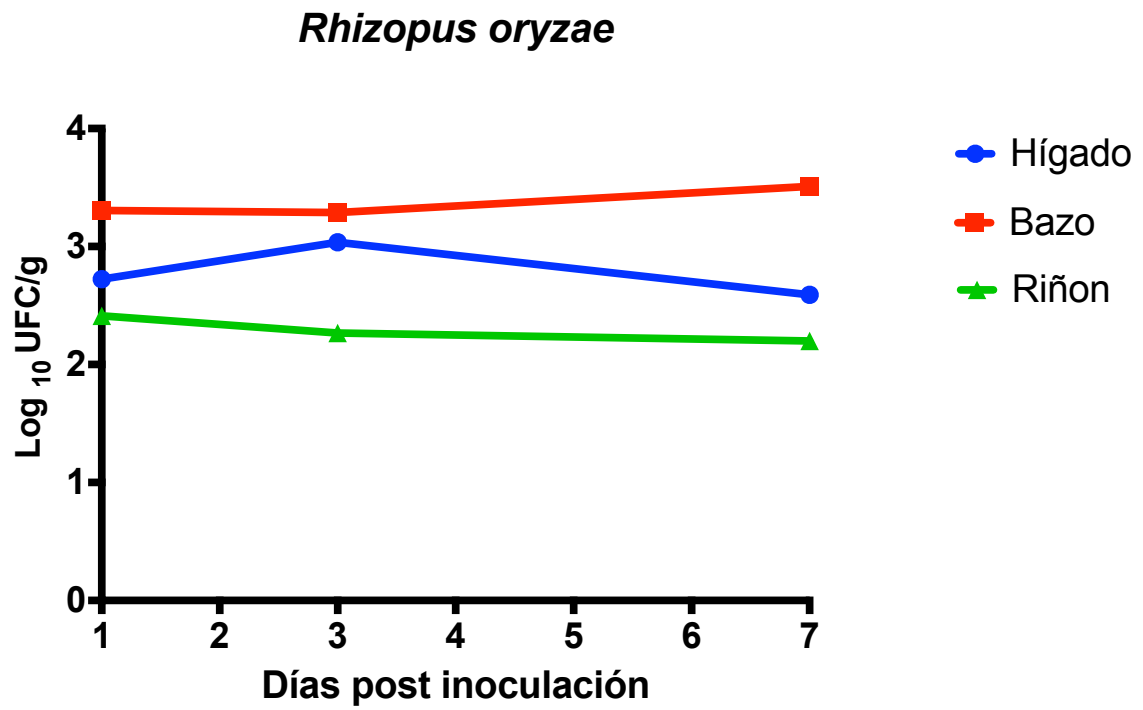


Fig.8 - Carga fúngica tisular en el modelo de infección sistémica por *R. oryzae*.

6.2 Modelo murino de infección por *Mucor circinelloides*

En esta infección se observó una elevación significativa de IL-17A e IL-1 β en los primeros días post-infección y se acompañaron en el tercer día de un aumento del resto de las citocinas estudiadas (Figura 8). La carga fúngica disminuyó rápidamente al mismo tiempo que las citocinas siguieron aumentando y su declive se mantuvo, pero se volvió más lento a medida que la concentración de citocinas en suero comenzó a reducirse alrededor del séptimo día de la infección (Fig. 9). IL-17A y TNF- α son las citocinas que se expresaron en niveles más altos durante el curso de la infección.

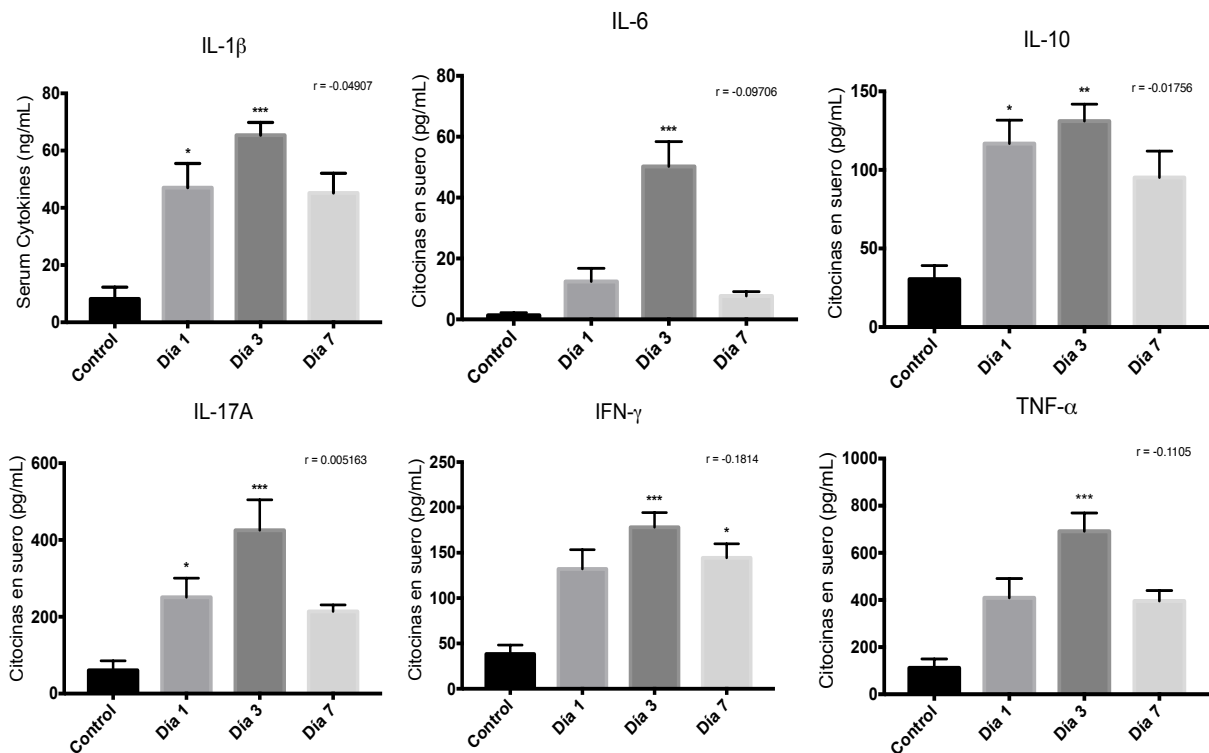


Fig.8 - Perfil de citocinas en el modelo de infección sistémica por *M. circinelloides*

Mucor circinelloides

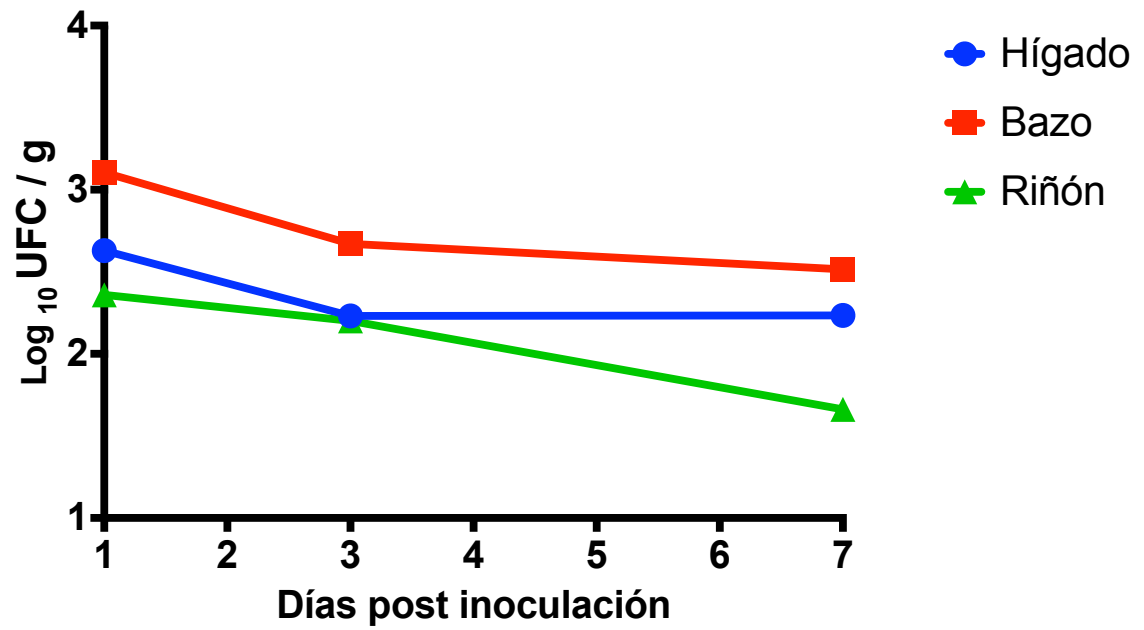


Fig. 9 - Carga fúngica tisular en el modelo de infección sistémica por *M. circinelloides*.

6.3 Modelo murino de infección por *Rhizomucor pusillus*

En la infección por *R. pusillus* se observó un rápido aumento de los niveles de todas las citocinas estudiadas en el primer día post-infección, especialmente TNF- α , al contrario de los modelos anteriores donde esta citocina se elevó principalmente en el día siete post-infección y de forma más gradual. Así mismo, los niveles de citocinas disminuyeron con menor rapidez durante el transcurso de la enfermedad, mostrando niveles estables de IL-6, IL-10 e IFN- γ (Figura 10). La carga fúngica en hígado, bazo y riñón disminuyó en los primeros días posteriores a la infección al tiempo que los niveles de citocinas se incrementaron, pero en este último órgano se encontró un aumento de la carga fúngica hacia el final de la infección, el cual coincide con la muerte de 2 de los 6 murinos restantes.

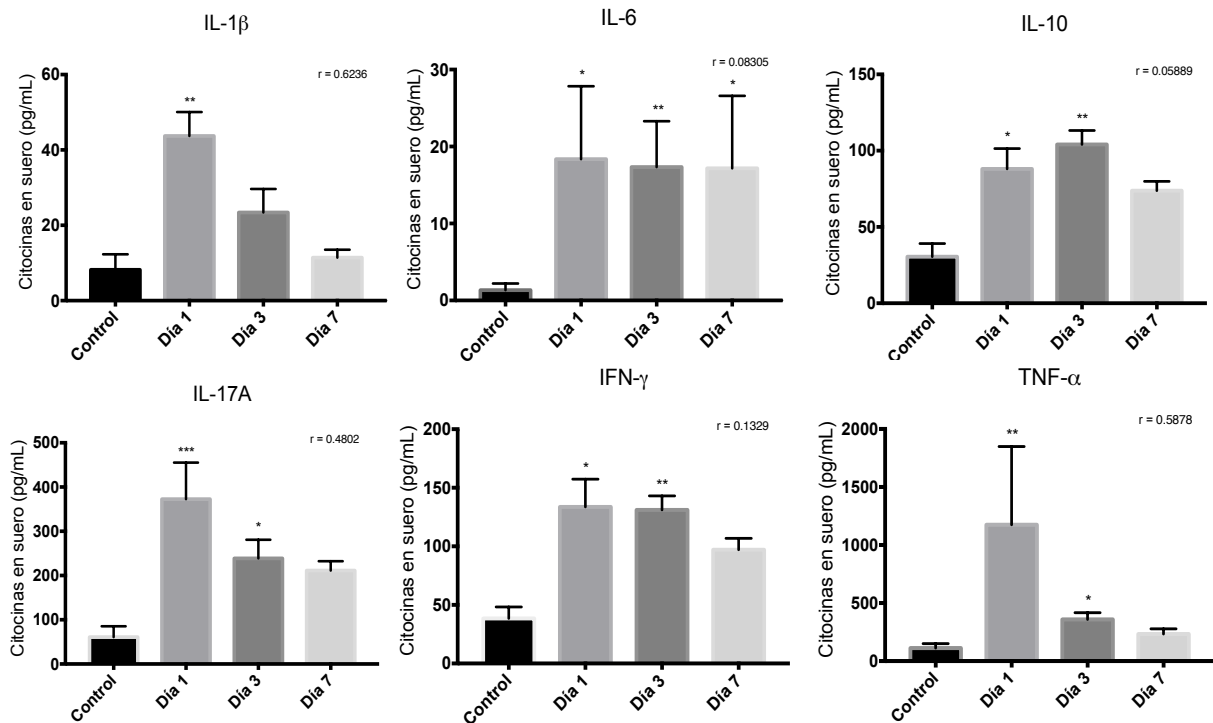


Fig. 10 - Perfil de citosinas en el modelo de infección sistémica por *R. pusillus*.

Rhizomucor pusillus

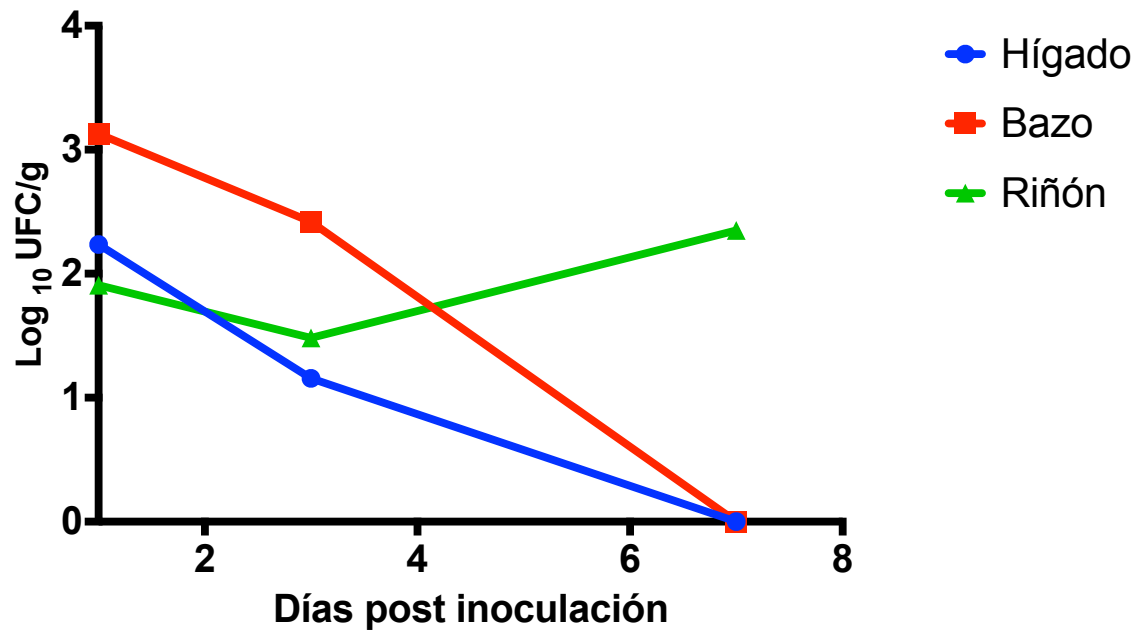


Fig. 11 - Carga fúngica tisular en el modelo de infección sistémica por *R. pusillus*.

6.4 Modelo murino de infección por *Lichtheimia corymbifera*

En el modelo murino de infección por *L. corymbifera* se observó un máximo aumento de los niveles de citocinas hacia el día 3 post-infección seguido de una disminución de los mismos para el día 7 posterior al reto. En esta infección los niveles de citocinas tanto proinflamatorias como aquellas con dominancia anti-inflamatoria son bajos en comparación con la infección por otros zigomicetos estudiados (Figura 12). Sin embargo, los niveles de IFN- γ se presentaron comparables a otros modelos y la carga fúngica en todos los órganos analizados mostró un decremento constante a partir de la infección animal (Figura 13).

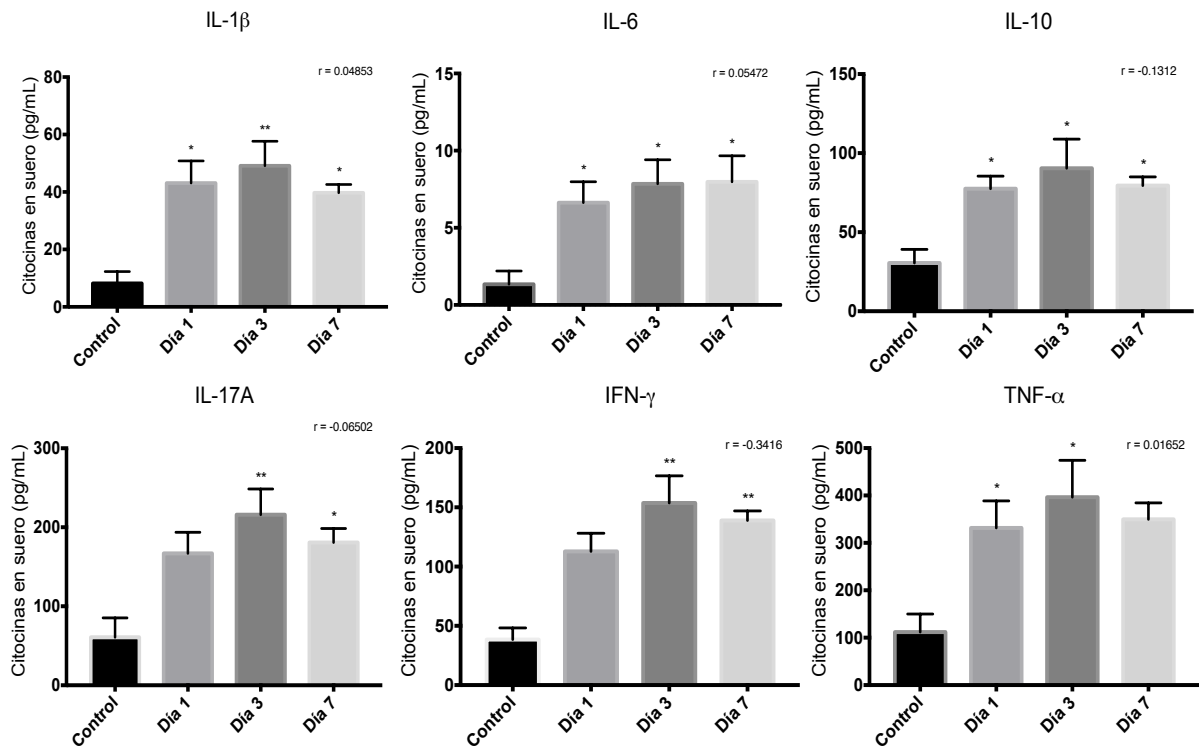


Fig. 12 - Perfil de citocinas en el modelo de infección sistémica por *L. corymbifera*.

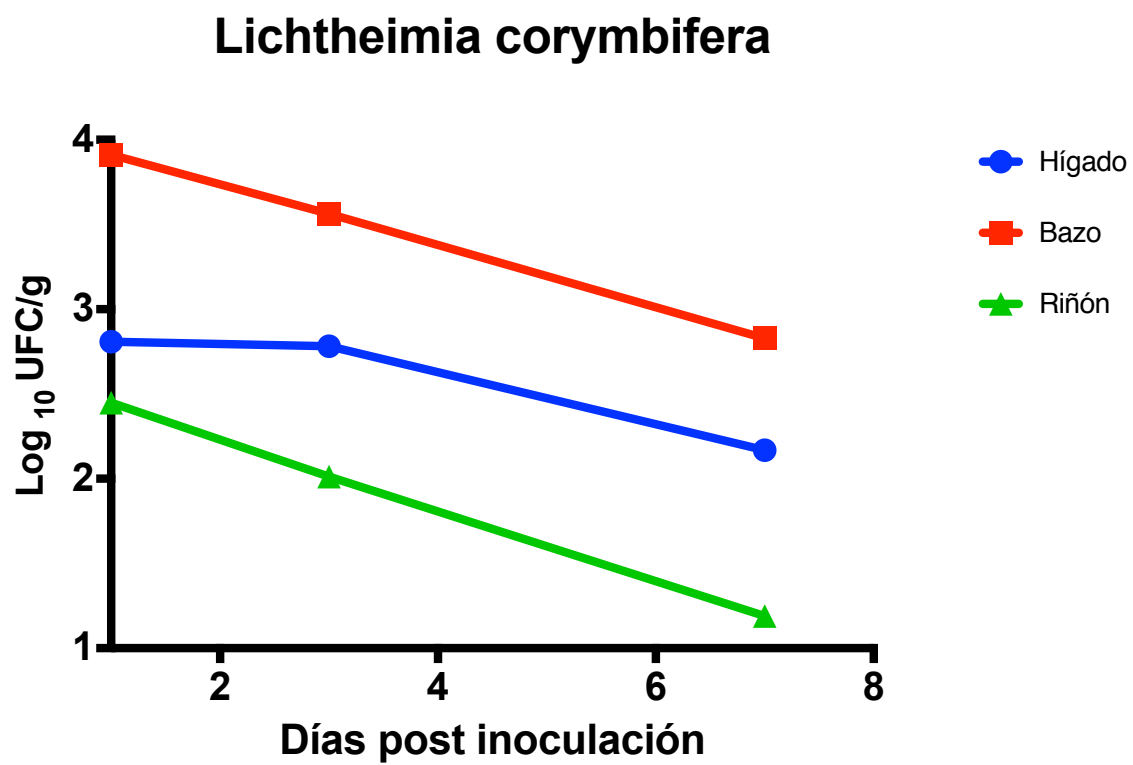


Fig. 13 - Carga fúngica tisular en el modelo de infección sistémica por *L. corymbifera*.

6.5 Modelo murino de infección por *Syncephalastrum racemosum*

En este modelo de infección encontramos que las citocinas tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias se elevaron en forma simultánea y gradual, alcanzando su máximo nivel en el día 7 post-infección (Figura 14). La carga fúngica por otro lado mostró una disminución lenta pero uniforme en todos los órganos, en concordancia con el incremento en la producción de las citosinas evaluadas.

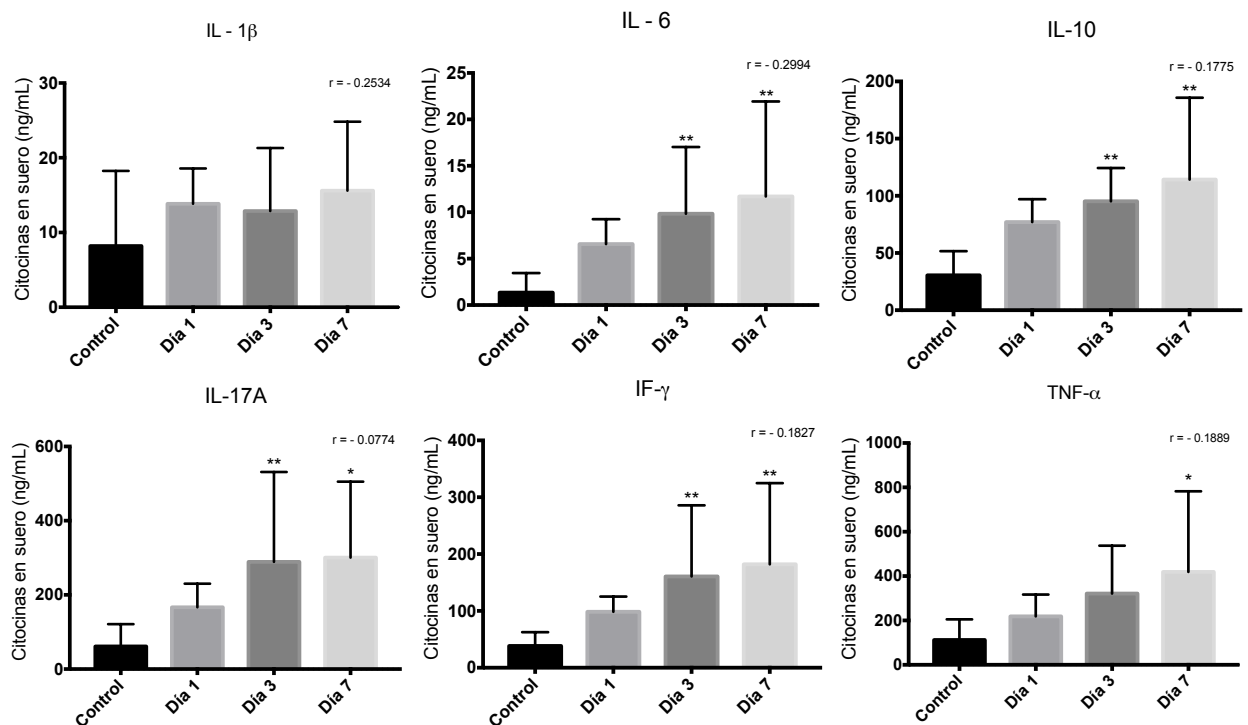


Fig. 14 - Perfil de citocinas en el modelo de infección sistémica por *S. racemosum*.

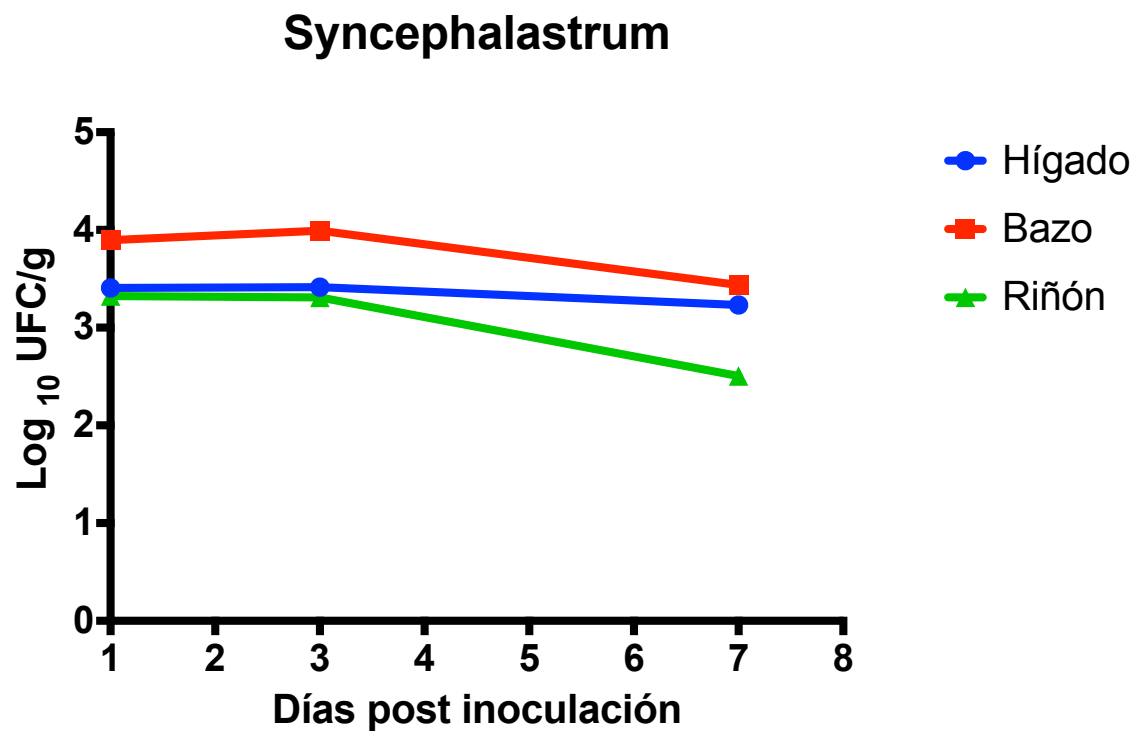


Fig. 15 - Carga fúngica tisular en el modelo de infección sistémica por *S. racemosum*.

6.6 Modelo murino de infección por *Cunninghamella bertholletiae*

En este modelo murino de infección encontramos el mayor número de animales fallecidos previo a la finalización del periodo de estudio, lo cual coincide con la mayor respuesta pro-inflamatoria caracterizada por el nivel más alto de IL-6 visto entre todos los modelos, con un promedio de 410.84 ± 198.42 ng/ μ L (Figura 16). Con respecto a la carga fúngica, aunque se presenta una disminución inicial de la misma en bazo y riñón, en el hígado se presentó un aumento de las UFCs. Para el día final de la infección (día 7) la carga fúngica en hígado y bazo fue de cero; sin embargo, en riñón se presentó una elevación de la misma con respecto a la obtenida en el día 3 posterior al reto intravenoso (Figura 17).

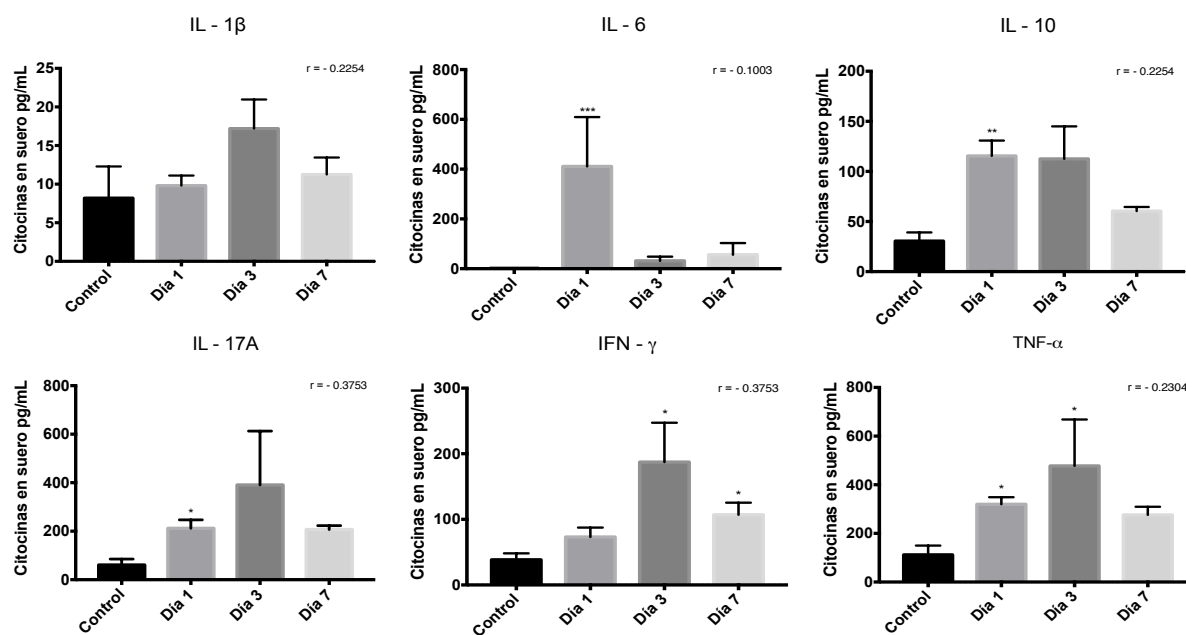


Fig. 16 - Perfil de citocinas en el modelo de infección sistémica por *C. bertholletiae*.

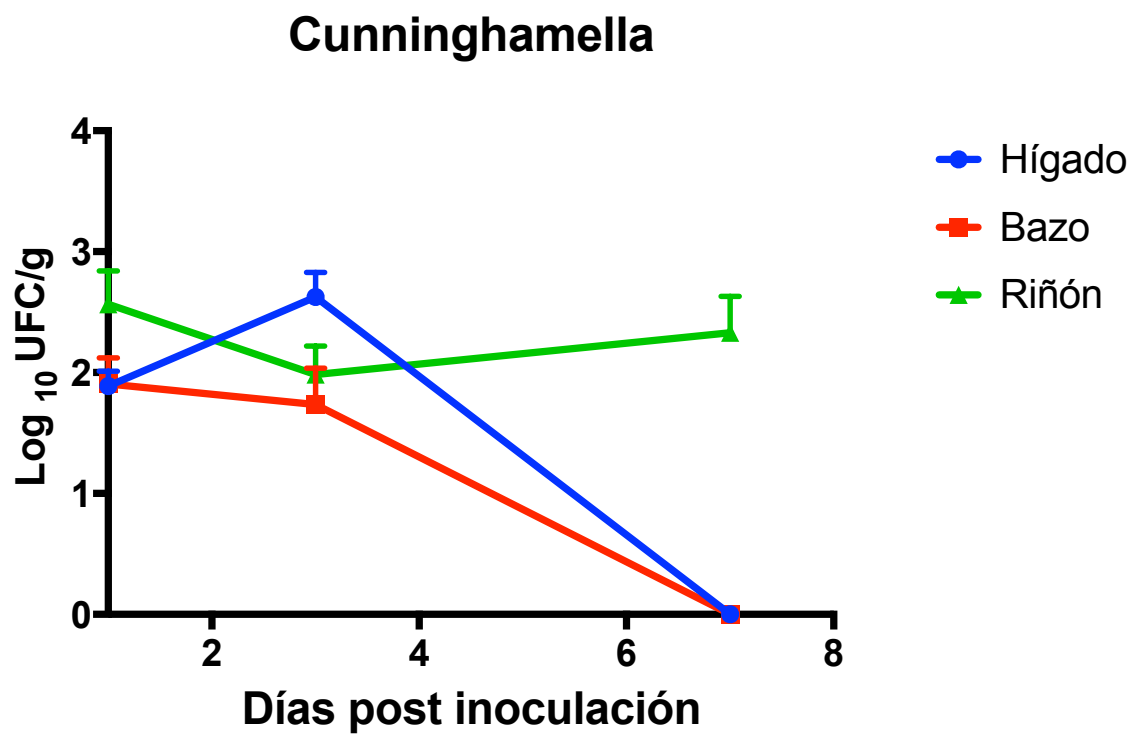


Fig. 17 - Carga fúngica tisular en el modelo de infección sistémica por *C. bertholletiae*.

6.7 Estrés oxidativo

Con respecto a la respuesta al estrés oxidativo, se encontró que todos los modelos de infección presentaron un aumento significativo de los niveles de SOD en el día 1 post-infección y éstos se fueron reduciendo hacia el final de la misma. La expresión enzimática de este antioxidante fue mayor en los modelos de infección por *C. bertholletiae*, *S. racemosum* y *R. oryzae* (Tabla 3).

Modelo murino	Control		Superóxido dismutasa		Valor de p	
	SOD	GPX	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7
<i>Rhizopus oryzae</i>	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6		
Hígado	21.00 ± 11.39	18.35 ± 7.24	35.18 ± 17.34	31.54 ± 10.81	< 0.0001	0.001
Bazo	26.56 ± 21.92	22.22 ± 20.49	151.34 ± 95.71	82.86 ± 38.25	<0.0001	<0.0001
Riñón	22.88 ± 15.59	18.14 ± 7.24	53.0 ± 30.57	19.80 ± 14.01	<0.0001	0.21
<i>Mucor circinelloides</i>			n = 6	n = 6		
Hígado			31.82 ± 20.54	12.73 ± 6.82	0.0002	0.005
Bazo			138.07 ± 159	81.94 ± 46.25	<0.0001	<0.0001
Riñón			92.49 ± 45.10	49.20 ± 20.80	<0.0001	<0.0001
<i>Rhizomucor pusillus</i>			n = 6	n = 4		
Hígado			32.40 ± 23.30	18.86 ± 17.45	0.002	0.058
Bazo			92.48 ± 45.10	46.66 ± 35.96	<0.001	<0.0001
Riñón			23.52 ± 12.89	25.85 ± 14.11	0.1227	0.004
<i>Lichtheimia corymbifera</i>			n = 6	n = 6		
Hígado			44.60 ± 34.45	33.09 ± 29.65	<0.0001	0.0001
Bazo			156.23 ± 133.93	44.44 ± 34.27	<0.0001	<0.001
Riñón			90.78 ± 56.47	31.82 ± 20.54	<0.0001	0.0004
<i>Syncephalastrum racemosum</i>			n = 6	n = 6		
Hígado			124.02 ± 100.54	64.21 ± 46.24	<0.0001	<0.0001
Bazo			233.55 ± 155.02	47.67 ± 32.02	<0.0001	<0.0001
Riñón			92.48 ± 45.10	36.89 ± 24.15	<0.0001	<0.0001
<i>Cunninghamella bertholletiae</i>			n = 6	n = 4		
Hígado			107.18 ± 44.41	42.39 ± 24.27	<0.0001	<0.0001
Bazo			253.96 ± 142.38	39.74 ± 30.34	<0.0001	<0.0001
Riñón			140.52 ± 76.39	42.61 ± 15.06	<0.0001	<0.0001

Tabla 3 – Los valores presentados representan el promedio de expresión de SOD y su desviación estándar en cada órgano de cada modelo de infección.

Los niveles de GPx presentados son menores que los de SOD; sin embargo, son estadísticamente significativos comparados con el control y en algunos casos tendieron a aumentar hacia el final de la infección, siendo mas notorio este efecto en los modelos murinos de infección por *R. oryzae* y *M. circinelloides* (Tabla 4).

Modelo murino	Control		Glutación peroxidasa		Valor de p	
	SOD	GPX	Día 1	Día 7	Día 1	Día 7
<i>Rhizopus oryzae</i>	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6		
Hígado	21.00 ± 11.39	18.35 ± 7.24	21.41 ± 13.10	28.98 ± 25.92	0.02	<0.0001
Bazo	26.56 ± 21.92	22.22 ± 20.49	32.39 ± 26.49	44.43 ± 23.81	0.0002	<0.0001
Riñón	22.88 ± 15.59	18.14 ± 7.24	33.74 ± 24.50	19.80 ± 14.01	<0.0001	0.1118
<i>Mucor circinelloides</i>			n = 6	n = 6		
Hígado			17.63 ± 8.41	30.31 ± 24.68	0.4277	0.0001
Bazo			29.22 ± 21.01	39.05 ± 27.31	0.0010	<0.0001
Riñón			34.47 ± 29.38	30.31 ± 24.68	<0.0001	0.0001
<i>Rhizomucor pusillus</i>			n = 6	n = 4		
Hígado			16.25 ± 14.05	8.67 ± 6.52	0.0619	0.0003
Bazo			26.15 ± 20.09	12.78 ± 9.33	0.0086	0.0003
Riñón			37.83 ± 32.48	37.72 ± 28.49	<0.0001	<0.0001
<i>Lichtheimia corymbifera</i>			n = 6	6 = 6		
Hígado			19.19 ± 17.33	8.67 ± 6.52	0.3617	0.0003
Bazo			29.02 ± 21.37	13.85 ± 11.05	0.0011	0.0005
Riñón			30.30 ± 24.03	24.43 ± 14.49	0.0001	0.0004
<i>Syncephalastrum racemosum</i>			n = 6	n = 6		
Hígado			26.28 ± 17.58	8.67 ± 6.52	0.0006	<0.0001
Bazo			35.13 ± 21.24	13.85 ± 11.05	<0.0001	0.0005
Riñón			34.30 ± 28.93	24.43 ± 14.49	<0.0001	0.0017
<i>Cunninghamella bertholletiae</i>			n = 6	n = 4		
Hígado			29.64 ± 17.99	11.07 ± 7.24	0.0002	0.0009
Bazo			41.50 ± 26.69	17.15 ± 8.91	<0.0001	0.3566
Riñón			40.72 ± 37.61	25.76 ± 13.48	<0.0001	0.0007

Tabla 4 – Los valores presentados representan el promedio de expresión de GPX y su desviación estándar en cada órgano de cada modelo de infección.

6.8 Histopatología

Se realizó análisis histopatológico de los órganos evaluados en todos los modelos murinos realizados y se efectuaron tinciones específicas para hongos, como son la tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS) y metenamina de plata (Gomori Grocott). Se detectó la presencia de hifas gruesas no septadas compatibles con zigomicetos en todos los modelos de infección. Sin embargo, no siempre se encontró su presencia en los tres órganos y cuando se encontraba eran lesiones circunscritas en pocas regiones de los mismos, ésto a pesar de que al momento de hacer cultivos se cuantificaron cargas fúngicas importantes. Se hipotetiza esto ocurre debido a que al ser un modelo inmunocompetente, la infección no se desarrolla en su forma más invasiva hacia el tejido, lo cual se sustenta también con base en la poca respuesta leucocitaria encontrada, tal que se observó solo la presencia de infiltrado linfocitario escaso alrededor de las áreas con presencia de hifas y necrosis de los tejidos afectados, especialmente en el parénquima renal (Fig 18 y 19).

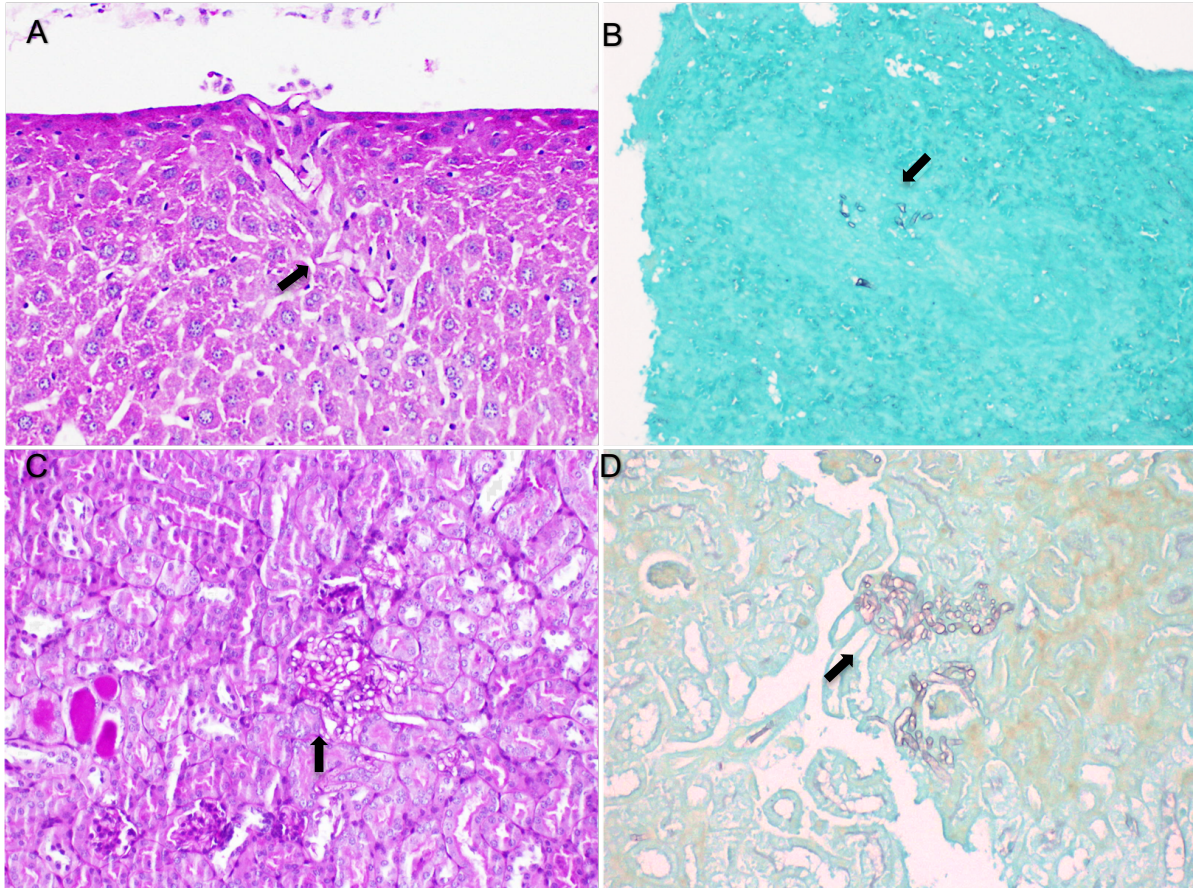


Fig. 18 – A) Corte histológico de hígado teñido con PAS. B) Histopatología de bazo teñido con metenamina de plata. C) Corte de riñón con la misma tinción. D) Corte de riñón con tinción de Gomori-Grocott. Señalado por las flechas presencia de hifas gruesas no septadas compatibles con infección por zigomicetos. Todo visualizado a 200x.

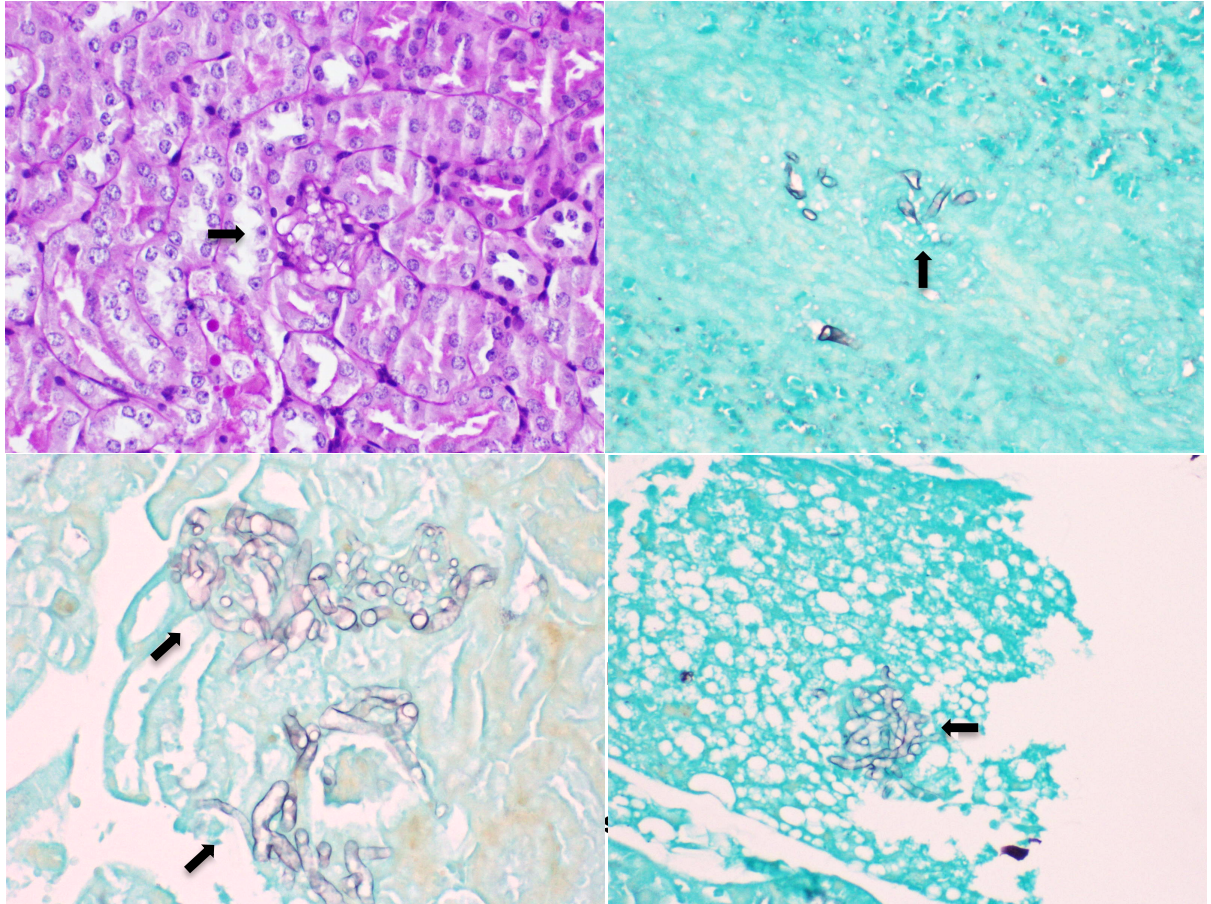


Fig. 18 – A) Corte histológico de riñón teñido con PAS. B) Histopatología de bazo teñido con metenamina de plata . C) Corte de Riñón y D) Corte de grasa perirrenal con tinción de Gomori-Grocott. Señalado por las flechas presencia de hifas gruesas no septadas compatibles con infección por zigomicetos. Todo visualizado a 400x.

CAPITULO 7

DISCUSIÓN

Las barreras físicas del transporte mucociliar, el mecanismo de la tos, las superficies mucosas, la piel intacta y los macrófagos alveolares que pueden fagocitar a las esporangiosporas antes de que se conviertan en hifas son parte de los mecanismos inmunes que interfieren en la entrada de los hongos mucorales a nuestro cuerpo; sin embargo, una vez concretada la infección las células del sistema inmune innato desencadenan una serie de respuestas variadas a través de la secreción de citocinas y quimiocinas (Roilides et al., 2012).

Aspergillus fumigatus y *Candida albicans* constituyen los modelos fúngicos más ampliamente estudiados, siendo empleados como organismos de referencia para inferir aspectos generales de la fisiopatología de las infecciones fúngicas. Sin embargo, desde el punto de vista inmunológico se han reportado diferencias notables entre estos hongos y los mucorales, de los cuales poco se sabe sobre sus mecanismos y características que llevan al establecimiento de la infección, así como sobre la respuesta inmune del hospedero frente a la invasión (Mendoza et al., 2015; Wurster et al., 2017). Las características clínicas y mortalidad de la enfermedad ocasionada por los mucorales varía dependiendo del sitio de infección y las condiciones del hospedero. Sin embargo, con base en lo que se conoce de otros hongos filamentosos como *Aspergillus* spp., se piensa que la

capacidad de evasión, reconocimiento y eliminación por el sistema inmune, también desempeña un papel importante en la patogenia (Binder et al., 2014).

Con respecto a la variedad de mucorales que se han reportado como causantes de enfermedad en el ser humano, la mayor parte de la literatura se centra en los mecanismos de respuesta inmune involucrados en la defensa contra *R. oryzae*, el patógeno más común de este grupo de hongos. Un estudio realizado en Noruega reporta el reconocimiento por receptores tipo-Toll 2 por parte de células mononucleares secundario a la infección por *R. oryzae*, lo que produce un estímulo importante en la liberación de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6 en comparación con la infección por *Aspergillus* spp. y niveles similares a los presentados al reto con *Lomentospora prolificans*. Esta diferencia en la respuesta de citocinas se postula es secundaria a diferencias en la morfología fúngica, ya que los fagocitos inducen diferentes respuestas con base en los cambios de su estructura. Aunque los macrófagos no son capaces de eliminar a las esporas fúngicas si son capaces de dañar a las hifas a través del estrés oxidativo, de la misma manera las esporas inactivas de *R. oryzae* no suelen inducir una respuesta inmune robusta, pero las hifas y esporas activas presentan una potente señal quimiotáctica. Adicionalmente, la activación de la producción de IL-23 dependiente de Dectina-1 produce una respuesta proinflamatoria tipo T_H17 (Mendoza et al., 2015; Warris et al., 2005).

En personas sanas los fagocitos ingieren las esporangiosporas de *R. oryzae* con menor efectividad en comparación con las conidias de *A. fumigatus*, de forma similar efectúan un menor daño en sus hifas. Existen incluso diferencias entre los zigomicetos, donde *L. corymbifera*, que suele ser menos virulenta, es afectada más gravemente por los fagocitos y evoca una respuesta oxidativa menor que *Rhizopus* spp. (Brieland et al., 2001). En un estudio diferente se asoció a *L. corymbifera* con la enfermedad del pulmón del granjero (neumonitis por hipersensibilidad), en la cual se encontró que este patógeno fúngico incrementa los niveles y la expresión de IL-8 (Bellanger et al., 2010).

C. bertholletiae es un agente poco común de infección; sin embargo, ocasiona una enfermedad más severa, agresiva y difícil de tratar. Simitsopoulou y colaboradores estudiaron la actividad de los neutrófilos humanos contra hifas de *R. oryzae*, *R. microsporus* y *C. bertholletiae*. En este estudio las hifas de *C. bertholletiae* fueron más resistentes al daño inducido por polimorfonucleares e indujeron un aumento significativo de los niveles de TNF- α y decremento de IL-8 en comparación con las especies de *Rhizopus* (Simitsopoulou et al., 2010).

En otro estudio, células mononucleares de sangre periférica, monocitos y células dendríticas fueron expuestas a: *A. fumigatus*, *Fusarium solani*, *C. bertholletiae*, *M. circinelloides*, *Mucor hiemalis*, *L. corymbifera*, *R. pusillus*, *Rhizopus arrhizus* y *Rhizopus microsporus* y se evaluó la expresión de genes de citocinas pro-inflamatorias así como la secreción de las mismas, encontrando una

alta inmunogenicidad aún en las esporas latentes de los mucorales, con una robusta inducción de IL-1 β y TNF- α , la cual se teoriza en este trabajo es secundaria a la ausencia de hidrofobinas en la pared celular de este grupo de hongos a diferencia de la mayoría de los ascomicetos (Wurster et al., 2017).

En nuestro trabajo se estudia por primera vez no solo un significativo de citocinas, sino la variedad en su producción a partir de los diferentes patógenos del grupo de los mucorales y, a diferencia de otros estudios, se hizo a través de su evaluación en un modelo murino de infección sistémica donde se logró analizar la progresión de la interacción entre la enfermedad y el hospedero, similar al estudio de (Bao et al., 2013) donde se describió el rol de IL-22 en la defensa temprana contra la infección por dos especies comunes de *Rhizomucor*.

En nuestro trabajo se encontró que todos los hongos mucorales indujeron una fuerte y rápida producción de citocinas tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias. En el modelo de infección por *R. oryzae* hubo un aumento significativo temprano de IL-1 β , IL-6 e INF- γ , el cual se acentuó aún más hacia el final del estudio. Posteriormente, hacia el día 7 post-infección y, asociado a una disminución en la carga fúngica, se presenta una elevación significativa de IL-10, IL-17A y, en consecuencia, de TNF- α . El rol de IL-17A ante las infecciones fúngicas ha sido ampliamente discutido y las conclusiones se inclinan a un papel protector. Sin embargo, algunos estudios han reportado que una desregulación de la misma pudiera conllevar a perpetuar las infecciones fúngicas. En nuestro

modelo de investigación la mayor elevación en los niveles de IL-17A hacia el séptimo día se relacionó con una ralentización en el aclaramiento fúngico en los órganos estudiados, donde el análisis de correlación de Spearman ($r=0.39$) indicó una asociación positiva. (Zelante et al., 2009).

En la infección por *M. circinelloides* los niveles de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ y TNF- α se elevaron en forma significativa en comparación con el control, alcanzado su máxima expresión hacia el día 3 post-infección, lo cual coincide con una caída rápida en la carga fúngica encontrada en hígado, bazo y riñón. Hacia el final de la infección solo IFN- γ continuó teniendo una elevación significativa. En comparación con el modelo de *R. oryzae*, la carga fúngica siguió presentando una caída constante y los niveles de citocinas se correlacionaron inversamente a los mismos.

En el modelo de infección por *R. pusillus* los niveles de IL-1 β , IL-17A y TNF- α se elevaron significativamente en la etapa inicial de la infección (día 1) a partir del cual sus niveles empezaron a disminuir y los niveles de IL-6, IL-10 e IFN- γ comenzaron a aumentar hacia el día 3 post-infección. En este modelo no todos los ratones sobrevivieron hasta el final de la infección, ya que dos de ellos debieron ser sacrificados en día 5 debido a signos de sufrimiento (aislamiento, piloerección, hiporexia y pérdida de peso, inmovilidad parcial). En este modelo la correlación entre las citocinas y la carga fúngica fue directamente proporcional. Los niveles elevados de citocinas al inicio de la infección parecen contribuir en la

enfermedad del animal al provocar un estado de hiperinflamación, lo cual se ha demostrado en otros modelos de infección (Perrone et al., 2010).

La infección por *L. corymbifera* se ha reportado como menos virulenta que otras especies de mucorales al ser mas vulnerable al daño en sus hifas inducido por fagocitos así como al estrés oxidativo (Roilides et al., 2014). En este trabajo todas las citocinas estudiadas presentaron un aumento estadísticamente significativo de sus niveles en los primeros días posteriores a la infección, con una disminución gradual hacia el final de la infección, pero manteniéndose significativamente elevadas en comparación con el grupo control. La correlación de los niveles de citocinas con respecto a la carga fúngica, la cual disminuyó rápidamente y se acentuó este descenso a partir del tercer día post-infección, fue inversamente proporcional, encontrando la mayor correlación al comparar carga fúngica con los niveles de $\text{INF-}\gamma$, lo que pone de manifiesto el papel relevante que tiene esta citocina en el control de la infección.

En la infección por *S. racemosum* las diferentes citocinas evaluadas no presentaron un incremento significativo en sus niveles hasta el tercer día posterior al reto y, algunas como $\text{TNF-}\alpha$, solo se documentó una diferencia significativa hacia el día siete o no hubo elevación significativa durante todo el tiempo del estudio, como $\text{IL-1}\beta$. Lo anterior parece coincidir con la carga fúngica en hígado, bazo y riñón, donde durante los primeros tres días la carga fúngica permaneció igual y posteriormente presenta un aumento a partir del día tres post-

infección en adelante coincidiendo con el aumento de los niveles de las citocinas pro-inflamatorias. La infección debida a *S. racemosum* ha sido reportada y comprobada como agente causal en forma definitiva solo en pocas ocasiones (Schlebusch & Looke, 2005); sin embargo, en nuestro modelo pareciera no inducir una respuesta inflamatoria rápida, por lo que probablemente sea poco virulenta.

En el modelo de infección por *C. betholletiae* se encontró la mayor letalidad, al haberse tenido que sacrificar cinco ratones antes del final del estudio debido a la presencia de signos graves de enfermedad (parálisis parcial, aislamiento y anorexia), como otros estudios han mostrado que esta especie de mucorales parece ser especialmente virulenta (Simitsopoulou et al., 2010). En nuestro estudio, los niveles de IL-6 que se presentaron desde el primer día de infección son los más altos encontrados en este trabajo y hasta 20 veces mayores que los encontrados en otros modelos, acompañándose de una elevación significativa de TNF- α e IL-17A, pero no de IL-1 β , la cual alcanza su máximo nivel al tercer día post-infección pero sin presentar significancia estadística al comparar con el grupo control. IL-6 es un efector que actúa sobre el hígado en la producción de proteínas reactantes de fase aguda, lo que en nuestro modelo coincide con la disminución de la carga fúngica en bazo e hígado; sin embargo, esta respuesta hiperinflamatoria parece ser defectuosa y asociarse con la letalidad temprana (día 3 y 4) de nuestro modelo.

Con respecto al estrés oxidativo, se encontró una gran producción de SOD y GPX en todos los órganos evaluados en los diferentes modelos de infección, con una predominancia a expresarse de forma más temprana SOD que GPX y la producción de ambos fue mayor en el riñón. En el modelo de infección por *C. bertholletiae* se encontraron los niveles más altos de SOD y, tanto SOD como GPX, se elevaron en mayor grado en los primeros días de la infección, correspondiendo aparentemente a un esfuerzo por evitar el daño a los tejidos, secundario a la fuerte respuesta inflamatoria de IL-6 que presenta este modelo en los primeros días posteriores al reto intravenoso.

CAPITULO 8

CONCLUSIÓN

En conclusión, se encontró que todos los modelos presentaron niveles importantes de citocinas pro-inflamatorias y en los cuales parece haber una correlación entre la producción de estas citocinas y el decremento en la carga fúngica; sin embargo, el papel que desempeñan durante la infección es desconocido, ya que en casos como el de infección por *C. bertholletiae* parecieran existir efectos deletereos de la hiperexpresión de algunos de estos mediadores de inflamación. Adicionalmente, se demostró que ante la infección por hongos mucorales, la IL-17A es fuertemente expresada; sin embargo, permanece la incógnita sobre si esta elevación es siempre benéfica o en los casos en los que se mantuvo elevada por más tiempo sin la regulación adecuada pudiera contribuir a la cronicidad de la infección. Estudios posteriores deben de ser realizados, ya que a pesar de nuevos medicamentos antifúngicos, la mortalidad de las enfermedades ocasionadas por este grupo de hongos continúa siendo muy alta y el uso clínico de citocinas como adyuvantes pudiera ser una herramienta más en el manejo de esta letal infección.

Capítulo 8

Bibliografía

- Armstrong-James, D., Brown, G. D., Netea, M. G., Zelante, T., Gresnigt, M. S., van de Veerdonk, F. L., & Levitz, S. M. (2017). Immunotherapeutic approaches to treatment of fungal diseases. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(12), e393-e402.
- Bao, W., Jin, L., Fu, H.-j., Shen, Y.-n., Lu, G.-x., Mei, H., Cao, X.-z., & Wang, H.-s. (2013). Interleukin-22 mediates early host defense against *Rhizomucor pusillus* can pathogens. *PloS one*, 8(6), e65065.
- Bellanger, A.-P., Reboux, G., Botterel, F., Candido, C., Roussel, S., Rognon, B., Dalphin, J.-C., Bretagne, S., & Millon, L. (2010). New evidence of the involvement of *Lichtheimia corymbifera* in farmer's lung disease. *Medical mycology*, 48(7), 981-987.
- Binder, U., Maurer, E., & Lass-Flörl, C. (2014). Mucormycosis—from the pathogens to the disease. *Clinical microbiology and infection*, 20, 60-66.
- Brieland, J. K., Jackson, C., Menzel, F., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., Halpern, J., Hurst, S., Muchamuel, T., Debets, R., & Kastelein, R. (2001). Cytokine networking in lungs of immunocompetent mice in response to inhaled *Aspergillus fumigatus*. *Infection and immunity*, 69(3), 1554-1560.
- Chayakulkeeree, M., Ghannoum, M. A., & Perfect, J. (2006). Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(4), 215-229.
- Cornely, O. A., Alastruey-Izquierdo, A., Arenz, D., Chen, S. C., Dannaoui, E., Hochhegger, B., Hoenigl, M., Jensen, H. E., Lagrou, K., & Lewis, R. E. (2019a). Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(12), e405-e421.
- Cornely, O. A., Alastruey-Izquierdo, A., Arenz, D., Chen, S. C., Dannaoui, E., Hochhegger, B., Hoenigl, M., Jensen, H. E., Lagrou, K., & Lewis, R. E. (2019b). Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *The Lancet Infectious Diseases*.
- Enoch, D. A., Yang, H., Aliyu, S. H., & Micallef, C. (2017). The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. *Human Fungal Pathogen Identification: Methods and Protocols*, 17-65.
- Farmakiotis, D., & Kontoyiannis, D. P. (2016). Mucormycoses. *Infectious disease clinics of North America*, 30(1), 143-163.

- Gebremariam, T., Liu, M., Luo, G., Bruno, V., Phan, Q. T., Waring, A. J., Edwards, J. E., Filler, S. G., Yeaman, M. R., & Ibrahim, A. S. (2014). CoH3 mediates fungal invasion of host cells during mucormycosis. *The Journal of clinical investigation*, 124(1), 237-250.
- Gresnigt, M. S., Rekiki, A., Rasid, O., Savers, A., Jouvion, G., Dannaoui, E., Parlato, M., Fitting, C., Brock, M., & Cavaillon, J.-M. (2016). Reducing hypoxia and inflammation during invasive pulmonary aspergillosis by targeting the Interleukin-1 receptor. *Scientific reports*, 6.
- Gupta, S., & Knapik, S. (2010). Chronic Invasive Pulmonary Scedosporium apiospermum Infection in an Immunocompetent Host. *CHEST Journal*, 138(4_MeetingAbstracts), 109A-109A.
- Katragkou, A., Walsh, T. J., & Roilides, E. (2014). Why is mucormycosis more difficult to cure than more common mycoses? *Clinical Microbiology and Infection*, 20(s6), 74-81.
- Kim, S. B., Cho, S.-Y., Lee, D.-G., Choi, J.-K., Lee, H.-J., Kim, S.-H., Park, S. H., Choi, S.-M., Choi, J.-H., & Yoo, J.-H. (2017). Breakthrough invasive fungal diseases during voriconazole treatment for aspergillosis: a 5-year retrospective cohort study. *Medical Mycology*, 55(3), 237-245.
- Koehler, P., Mellinghoff, S. C., Lagrou, K., Alanio, A., Arenz, D., Hoenigl, M., Koehler, F. C., Lass-Flörl, C., Meis, J. F., & Richardson, M. (2019). Development and validation of the European QUALity (EQUAL) score for mucormycosis management in haematology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(6), 1704-1712.
- Kontoyiannis, D. P., Lionakis, M. S., Lewis, R. E., Chamilos, G., Healy, M., Perego, C., Safdar, A., Kantarjian, H., Champlin, R., & Walsh, T. J. (2005). Zygomycosis in a tertiary-care cancer center in the era of Aspergillus-active antifungal therapy: a case-control observational study of 27 recent cases. *Journal of Infectious Diseases*, 191(8), 1350-1360.
- Kumaresan, P. R., Manuri, P. R., Albert, N. D., Maiti, S., Singh, H., Mi, T., Roszik, J., Rabinovich, B., Olivares, S., & Krishnamurthy, J. (2014). Bioengineering T cells to target carbohydrate to treat opportunistic fungal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(29), 10660-10665.
- Lass-Flörl, C. (2009). Zygomycosis: conventional laboratory diagnosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(s5), 60-65.
- Lewis, R. E., Liao, G., Wang, W., Prince, R. A., & Kontoyiannis, D. P. (2011). Voriconazole pre-exposure selects for breakthrough mucormycosis in a mixed model of Aspergillus fumigatus-Rhizopus oryzae pulmonary infection. *Virulence*, 2(4), 348-355.
- Lui, G., Lee, N., Ip, M., Choi, K., Tso, Y., Lam, E., Chau, S., Lai, R., & Cockram, C. (2006). Cryptococcosis in apparently immunocompetent patients. *Qjm*, 99(3), 143-151.
- Meena, D. S., Kumar, D., & Bohra, G. K. (2023). Combination therapy in Mucormycosis: Current evidence from the world literature, a mini review. *Journal of Medical Mycology*, 33(1), 101332.

- Mendoza, L., Vilela, R., Voelz, K., Ibrahim, A. S., Voigt, K., & Lee, S. C. (2015). Human fungal pathogens of Mucorales and Entomophthorales. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(4), a019562.
- Oren, I., & Paul, M. (2014). Up to date epidemiology, diagnosis and management of invasive fungal infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(s6), 1-4.
- Perrone, L. A., Szretter, K. J., Katz, J. M., Mizgerd, J. P., & Tumpey, T. M. (2010). Mice lacking both TNF and IL-1 receptors exhibit reduced lung inflammation and delay in onset of death following infection with a highly virulent H5N1 virus. *The Journal of infectious diseases*, 202(8), 1161-1170.
- Petrikkos, G., Skiada, A., Lortholary, O., Roilides, E., Walsh, T. J., & Kontoyiannis, D. P. (2012). Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clinical infectious diseases*, 54(suppl 1), S23-S34.
- Pozo, L. J., Pontes, M. A., Pozo, S. C., Robles, A. J., & Linares, S. M. (2014). Disseminated mucormycosis in immunocompetent patients: A disease that also exists. *Revista iberoamericana de micologia*, 32(2), 63-70.
- Prakash, H., & Chakrabarti, A. (2019). Global epidemiology of mucormycosis. *Journal of Fungi*, 5(1), 26.
- Roden, M. M., Zaoutis, T. E., Buchanan, W. L., Knudsen, T. A., Sarkisova, T. A., Schaefele, R. L., Sein, M., Sein, T., Chiou, C. C., & Chu, J. H. (2005). Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clinical infectious diseases*, 41(5), 634-653.
- Roilides, E., Antachopoulos, C., & Simitsopoulou, M. (2014). Pathogenesis and host defence against Mucorales: the role of cytokines and interaction with antifungal drugs. *Mycoses*, 57(s3), 40-47.
- Roilides, E., Kontoyiannis, D. P., & Walsh, T. J. (2012). Host defenses against zygomycetes. *Clinical infectious diseases*, 54(suppl 1), S61-S66.
- Saoulidis, S., Simitsopoulou, M., Dalakiouridou, M., Walsh, T. J., Wheat, L. J., Papaioannidou, P., & Roilides, E. (2011). Antifungal activity of posaconazole and granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of disseminated zygomycosis (mucormycosis) in a neutropaenic murine model. *Mycoses*, 54(5), e486-e492.
- Schlebusch, S., & Looke, D. F. (2005). Intraabdominal zygomycosis caused by *Syncephalastrum racemosum* infection successfully treated with partial surgical debridement and high-dose amphotericin B lipid complex. *Journal of clinical microbiology*, 43(11), 5825-5827.
- Simitsopoulou, M., Georgiadou, E., Walsh, T. J., & Roilides, E. (2010). *Cunninghamella bertholletiae* exhibits increased resistance to human neutrophils with or without antifungal agents as compared to *Rhizopus* spp. *Medical mycology*, 48(5), 720-724.
- Spellberg, B., & Ibrahim, A. S. (2010). Recent advances in the treatment of mucormycosis. *Current infectious disease reports*, 12(6), 423-429.
- Sridhara, S. R., Paragache, G., Panda, N. K., & Chakrabarti, A. (2005). Mucormycosis in immunocompetent individuals: an increasing trend. *Journal of otolaryngology*, 34(6).

- Standard. (2017). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 3rd ed. . Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.
- Vallabhaneni, S., Mody, R. K., Walker, T., & Chiller, T. (2016). The global burden of fungal diseases. *Infectious disease clinics of North America*, 30(1), 1-11.
- Warris, A., Netea, M. G., Verweij, P. E., Gaustad, P., Kullberg, B.-J., Weemaes, C. M., & Abrahamsen, T. G. (2005). Cytokine responses and regulation of interferon-gamma release by human mononuclear cells to *Aspergillus fumigatus* and other filamentous fungi. *Sabouraudia*, 43(7), 613-621.
- Wurster, S., Thielen, V., Weis, P., Walther, P., Elias, J., Waaga-Gasser, A. M., Dragan, M., Dandekar, T., Einsele, H., & Löffler, J. (2017). Mucorales spores induce a proinflammatory cytokine response in human mononuclear phagocytes and harbor no rodlet hydrophobins. *Virulence*, 8(8), 1708-1718.
- Zelante, T., De Luca, A., D'Angelo, C., Moretti, S., & Romani, L. (2009). IL-17/Th17 in anti-fungal immunity: What's new? *European journal of immunology*, 39(3), 645-648.

CAPÍTULO 9

RESÚMEN AUTOBIOGRÁFICO

Nací en Monterrey, Nuevo León el día 06 de agosto de 1982. Ingresé a la Esc. Primaria “Prof. Pablo Cantú Villarreal” (Anexa a la Normal) en 1988, egresando en el año de 1994, tras lo cual curse estudios de nivel secundaria en la Esc. Sec. No. 7 “Margarita Maza de Juárez”, generación 1994-1997. Posteriormente ingresé a la preparatoria “Tec. Rómulo Garza”, donde realice estudios de preparatoria 1997-2000, durante este periodo inicié estudios para certificarme como Instructor de la Lengua Inglesa, mismos que concluyeron en el año 2001. Realicé estudios universitarios en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), donde obtuve el título de Médico Cirujano y Partero, habiéndome graduado en la generación 2004-2010. Llevé a cabo mi servicio social en la comunidad de “Congregación Calles”, Montemorelos, N.L. del 2010 al 2011. Posteriormente ingresé a la especialidad de Medicina Interna, en el Hospital Universitario de la UANL, la cual cursé del año 2011 al 2015 y, posteriormente, realicé la subespecialidad en Infectología del año 2015 al 2017. Realicé el Master en Micología Médica en el año 2024 por la Universidad del País Vasco.