



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

Efecto de la toxina Cry 1Ac DE *Bacillus thuringiensis* sobre el
Crecimiento de Hongos Alergénicos

QUE PARA OBTENER EL TITULO
DE
QUIMICO FARMACOBIOLOGO

SALVADOR SÁNCHEZ NAFARRATE

D en C. Alain R. Rodríguez Orozco.
DIRECTOR DE TESIS

Q.F.B. Héctor Ruiz Reyes
CODIRECTOR

MORELIA, MICHOACAN Noviembre 2005

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a mis padres y hermanos por toda la confianza y paciencia, por el apoyo a lo largo de mi carrera ya que a ambos les costo una gran esfuerzo, para ustedes es mi más grande admiración.

A el D en C. Alain R. Rodríguez Orozco por todo su apoyo, sugerencias y confianza. en la dirección de esta tesis.

A el Q.F.B. Héctor Ruiz Reyes por su gran apoyo y por compartir su conocimiento y sus valiosas enseñanzas que van más allá de lo académico.

A mis amigos, por que con ellos he aprendido y compartido tantos momentos, por tener siempre su mano y confiar en mí.

A las Q.F.B. Miembros del comité revisor de tesis, Bertha Ballesteros Silva Rebeca Tinoco Martínez, Martha Josefina de los dolores Torres, por sus observaciones y aclaraciones que enriquecieron el presente trabajo.

Gracias a todos los que directa o indirectamente contribuyeron.

CONTENIDO.

Glosario

Lista de figuras

Figura 1.-----Las vías aéreas superiores

Figura 2.-----Reacciones alérgicas.

Figura 3.----- Síntomas de la rinitis alérgica.

Figura 4.-----Etapas de la reacción alérgica.

Figura 5.-----Entrecruzamiento de la IgE.

Figura 6.----- Estructura de la inmunoglobulina E y sus sitios de unión

Figura 7.----- δ -endotoxinas, en forma de cristales (proteínas Cry y Cyt).

Figura 8.-----Dominios de la protoxina Cry 1Ac de *Bacillus thuringiensis*.

Figura 9.-----Modo de acción de la toxina de *Bacillus thuringiensis*.

Figura 10.-----SDS-PAGE de la toxina Cry 1Ac.

Lista de tablas.

Tabla 1.-----Distribución de receptores Fc de la IgE

Tabla 2.----- Principales polisacáridos de la pared celular de los hongos

Tabla 3.----- Clasificación de los hongos alergénicos

Tabla 4.-----Antimicóticos tópicos y sistémicos

Tabla 5.-----Clasificación de las proteínas Cry

Tabla 6.-----Diluciones de la protoxina Cry 1Ac en cultivos de células mononucleadas

Tabla 7.-----Sensibilidad de la protoxina Cry 1Ac sobre el crecimiento de hongos alergénicos.

I. INTRODUCCION

II. ANTECEDENTES

Antecedentes generales

Antecedentes específicos

III. JUSTIFICACION:

VI. HIPÓTESIS

V. OBJETIVOS

Objetivo general:

Objetivos específicos:

VI. MATERIAL Y METODOS

VII. RESULTADOS

VIII.DISCUSIÓN

IX.CONCLUSIONES

X. ANEXO 1

XI. ANEXO 2

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

INDICE DE ABREVIATURAS

Bth	<i>Bacillus thuringiensis</i>
°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
g	Gramos
HCl	Ácido clorhídrico
hr	Hora
IFN-γ	Interferón gamma
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
ISSSTE	Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado
L	Litros
LB	Linfocitos B
Lb	Libras
LT	Linfocitos T
mg	Miligramos
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
min.	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PDA	Agar papa dextrosa
TCR	Receptor de la célula T
TH	Linfocito T helper
CMI	Concentración mínima inhibitoria
APC	Célula presentadora de antígeno
NCCLS	Comité norteamericano de estándares en laboratorios clínicos

RESUMEN

Antecedentes:

La rinitis alérgica es un problema de salud importante a nivel mundial, que principalmente se presenta en niños y adolescentes. Los hongos son causa frecuente de sensibilización alérgica. La búsqueda de nuevos funguicidas e inmunomoduladores de la respuesta inmune a hongos. es una alternativa para dar solución al creciente problema de rinitis alérgica asociada a hongos.

Objetivo del estudio:

Se estudió el efecto de la toxina Cry 1Ac de *Bacillus thuringiensis* sobre el crecimiento de los hongos alérgicos

Material y métodos:

Se determinó la morfología macroscópica y microscópica de hongos aislados de exudados nasales de pacientes con rinitis alérgica.

Se cultivaron células mononucleadas, mediante el método de selección por gradiente de densidad 1.077 (Ficoll-Hypaque).

Se utilizó medio RPMI 1640 y suero fetal bovino inactivado al 10% para el crecimiento de los monocitos., que se estimularon con distintas concentraciones de Cry 1Ac, a las 72 horas se obtuvieron sobrenadantes de cultivos y posteriormente se utilizaron para la realización de fungigramas.

Se realizaron fungigramas con toxina pura y a diferentes concentraciones

Resultados:

Las cepas fúngicas se biotipificaron por equipo **Biolog**, identificando los siguientes géneros: *Absidia sp*, *Aspergillus sp*, *Alternaria sp*, *Penicillium sp*, *Eupenicillium sp*, *Fusarium sp*, y *Cladosporium sp*.

Se realizó la identificación macroscópica y microscópica con tinción azul de lactofenol encontrando una relación del 100% con los biotipificados por equipo **Biolog**. En las pruebas de sensibilidad: los sobrenadantes (discos con 20µL) no presentaron inhibición frente a las cepas de hongos alérgicos.

La toxina Cry 1Ac pura a diferentes concentraciones, e impregnado con 20 µL/disco, inhibió el crecimiento fúngico. Los hongos que presentaron inhibición

de su crecimiento fueron *Alternaria sp*, a 31.25µg/mL, *Absidia sp* a 500µg/mL y *Eupenicillium sp* a 500µg/mL el diámetro fue de 2mm y consecutivo en los tres hongos y comparables con Anfotericina B como control positivo.

Conclusiones:

Los sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas activadas por Cry 1Ac, no presentan propiedades antifúngicas.

La protoxina Cry 1Ac a diferentes concentraciones inhibió el crecimiento fúngico en *Alternaria sp*, *Absidia sp* y *Eupenicillium sp*

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades alérgicas representan un grave problema de salud pública, principalmente en los países industrializados, afectando a casi 500 millones de personas en el mundo, enfermedades como rinitis, asma, dermatitis atópica y conjuntivitis están condicionadas a factores ambientales y a la predisposición genética de cada individuo, ocupando uno de los primeros lugares de los motivos de atención médica y hospitalización entre las enfermedades crónicas de los niños y los adolescentes, además, es un proceso que incrementa los costos, el ausentismo escolar-laboral y suele tener otras repercusiones sociales negativas.^{1,2}

La rinitis alérgica es la enfermedad producida por la inflamación de la mucosa de las fosas nasales, y se caracteriza clínicamente por síntomas de obstrucción nasal y congestión de las áreas adyacentes (senos paranasales), puede acompañarse de prurito nasal y estornudos. La rinitis alérgica puede ser producida por aeroalérgenos como: polvo casero, ácaros, epitelios de animales, pólenes, malezas y hongos.³

La inhalación sistémica de esporas de hongos puede inducir patología alérgica respiratoria, tanto de vías aéreas superiores como de inferiores, en personas sensibles. Las esporas de los hongos contienen moléculas como glucoproteínas, proteínas y polisacáridos que pueden desencadenar reacciones de hipersensibilidad de tipo I mediada por IgE.⁴

Los hongos de mayor importancia desde el punto de vista alergológico, por su predominio y potencia alergénica, pertenecen a los géneros de *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Helminthosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Aureobasidium*,^{5, 6,7} incluyendo a algunos basidiomicetos como *Schizophyllum común*.⁸

La alergenicidad de los hongos y sus esporas no está sólo en función de su antigenicidad, sino de su presencia en el medio ambiente, su generación, su liberación, su transporte y el depósito en las mucosas de un huésped susceptible.⁹

Por otra parte, los problemas de seguridad y toxicidad de los fármacos antifúngicos principalmente de los polienos (anfotericina B y nistatina) o de aparición de resistencias sobre todo a fluconazol hacen que exista la inquietud por el desarrollo de nuevos antifúngicos con ventajas apreciables.¹⁰ La frecuencia y gravedad de las micosis como la aparición de diferentes formas clínicas de las micosis clásicas y de nuevas infecciones, es cada vez más importante en la patología humana.

Existe un incremento del empleo de los antifúngicos sistémicos y esto ha ejercido una importante presión sobre la necesaria investigación para la obtención y desarrollo de nuevas inmunoterapias sistémicas. Aún mas si tenemos en cuenta que el tratamiento de las infecciones graves invasoras esta limitado al uso de la anfotericina B.¹⁰

La protoxina Cry 1Ac del *Bacillus thuringiensis* se ha utilizado en ensayos inmunológicos activando células mononucleadas de humanos, se ha demostrado que esta protoxina aumenta la respuesta inmunológica por ser un potente inmunógeno y adyuvante de mucosas. Se han realizado trabajos experimentales *in vitro* para observar el efecto bactericida de sobrenadantes de células mononucleadas activadas por la protoxina Cry 1Ac, dando resultados satisfactorios, sobre todo en la inhibición de microorganismos como *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Moraxela catarralis*, *Salmonella* y *Shigella*.¹¹

Debido a estos antecedentes, el presente trabajo va encaminado a la valoración del efecto de Cry 1Ac de *Bacillus thuringiensis*, en cepas de hongos alergénicos aislados de pacientes con diagnóstico de rinitis alérgica.

ANTECEDENTES GENERALES

La nariz es un órgano complejo que cumple con una serie de funciones: es parte importante de la vía aérea superior, filtra partículas hasta de 30 micrones, calienta y humidifica el aire que va a llegar a los pulmones, es responsable de la olfacción y quimiosensación provocada por sustancias tóxicas, modifica la voz por efecto de resonancia y además es fuente de reflejos que afectan a todo el organismo.¹²

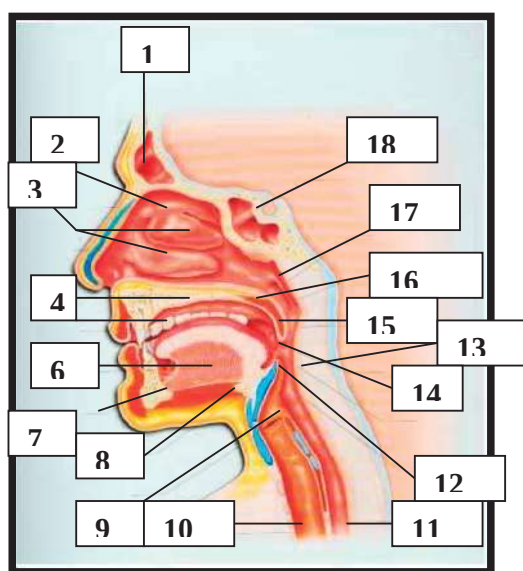


Figura 1. Las vías aéreas superiores
(Atlas Sistema Respiratorio- MSD).

- 1.- Seno frontal
- 2.- Cavidad nasal
- 3.- Cornetes
- 4.- Paladar óseo
- 5.- Dientes
- 6.- Lengua
- 7.- Maxilar inferior
- 8.- Hioides
- 9.- Cuerdas vocales
- 10.- Tráquea
- 11.- Esófago
- 12.- Epiglotis
- 13.- Faringe
- 14.- Amígdala palatina
- 15.- Úvula
- 16.- Paladar blando
- 17.- Nasofaringe
- 18.- Seno esfenoidal

Características de la nariz:

El aire ingresa a los pulmones a través de las fosas nasales. La nariz **filtra** el aire, le da humedad y la **temperatura** necesaria para que llegue a los pulmones en las condiciones más favorables; en otras palabras, el aire que penetra por la boca contiene impurezas y gérmenes o puede ser muy frío, por lo que es más irritante que el aire que llega a través de la nariz. Para lograr todos estos efectos la nariz cuenta con una estructura de cartílagos, huesos y de una capa que los reviste llamada “mucosa”, de características ultra especializadas.¹³

En la estructura de las mucosas de las vías respiratorias superiores e inferiores existe cierta similitud. Ambas poseen un epitelio pseudoestratificado, cilíndrico y ciliado; en la submucosa hay vasos sanguíneos, glándulas mucosas, terminaciones nerviosas, fibroblastos y células inflamatorias, como: monocitos, linfocitos, y células cebadas.

Alergia

El término alergia, se define como una reacción inmunológica específica a una sustancia normalmente inocua, una sustancia que no causa problemas a otras personas. Esta reacción inmunológica, es una reacción llevada a los extremos.

Esta puede manifestarse en forma de asma, rinitis, urticaria, o de dermatitis eczematosa. En general, hay una predisposición familiar a padecerlas, sin embargo, pueden presentarse en individuos sin antecedente alguno.

Las personas que tienen alergias, usualmente la tienen a más de una sustancia, o tienen manifestaciones alérgicas en más de un órgano. Esto es debido a que todo el organismo es alérgico y no solamente una parte de él. Los productos que con mayor frecuencia causan alergias (alergenos) son: alimentos, esporas de hongos, látex, medicinas, partículas de polvo, pólenes, y venenos para insectos.¹⁴

Un alérgeno es un antígeno que provoca la producción de IgE por parte del sistema inmune, e induce, tras unirse a esta inmunoglobulina, una reacción alérgica. Los alergenosen más comúnmente asociados a enfermedades atópicas son los inhalados (aeroalérgenos) y alimentarios.

Los aeroalergenosen son partículas transportadas por el aire, capaces de producir alergia respiratoria, cutánea o conjuntival. El aire inspirado contiene numerosos agentes nocivos e irritantes, incluyendo irritantes aéreos gaseosos, tales como óxido de nitrógeno o azufre y ozono, así como alergenosen medioambientales.¹⁵ Las sustancias que con mayor frecuencia producen cuadros alérgicos, a través de la inhalación, son los pólenes, esporas de hongos, diferentes tipos de polvo, ácaros, epitelio de animales, y otras sustancias que invaden directamente la mucosa respiratoria. La mayor parte de los alergenosen transportados por el aire suelen ser proteínas o sustancias unidas a proteínas. La mayoría resultan ser glicoproteínas

solubles, sin características físico-químicas especiales, salvo un peso molecular comprendido entre 10.000 y 40.000 daltons. Aún es menos conocida la actividad biológica de alguna de estas proteínas. El tamaño de los aeroalérgenos es también importante. Los alérgenos mejor conocidos varían entre 1 y 60 μm . Las partículas de polen anemófilo, por ejemplo, miden entre 20 y 60 μm , las esporas de hongos habitualmente varían entre 3 μm y 30 μm . Las partículas de polvo tienen de 1 μm a 10 μm .



Figura 2 Reacciones alérgicas.

http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/19150.htm

Los mecanismos protectores de la mucosa nasal y de las vías respiratorias, a través de los cilios que transportan las partículas a orofaringe siendo estas deglutidas y desnaturalizadas rápidamente en estómago, eliminan la mayoría de las partículas más grandes, de tal manera que sólo aquellas de 3 μm o menores son capaces de alcanzar los alvéolos pulmonares. Ello explica una mayor exposición de las mucosas nasal y conjuntival y de las vías respiratorias superiores. Sin embargo, puesto que la mayoría de las partículas, al menos las mayores, dado su tamaño, no penetran en los bronquios terminales y alvéolos deben considerarse otros mecanismos alternativos de respuesta de las vías aéreas.

Rinitis

Es el síndrome producido por la inflamación de la mucosa de las fosas nasales, que se caracteriza clínicamente por síntomas de obstrucción nasal y congestión de las áreas adyacentes (es frecuente la afectación ocular y de senos paranasales).

Suele acompañarse de prurito nasal y estornudos. Considerada en conjunto constituye unos de los motivos más frecuentes en medicina general.

La calidad de vida se ve afectada por la rinitis, ya que entorpece la actividad diaria, dificulta la concentración y por tanto disminuye rendimientos escolares y laborales, entorpece las relaciones sociales e impide el sueño. Por todo ello constituye una causa de abstencionismo laboral y escolar.

Rinitis alérgica

Es una enfermedad de las vías aéreas superiores causada por la exposición de la membrana mucosa a materiales alérgicos en individuos sensibilizados y está mediada por mecanismos inmunológicos.

La Rinitis alérgica puede clasificarse como perenne o estacional; la primera aparece durante todo el año y la segunda sólo en una época que varía según el agente causal, en general.¹⁶

La inflamación de la mucosa nasal y bronquial, ha quedado demostrado en diversos estudios se distingue por un infiltrado inflamatorio similar que incluye; eosinófilos, células cebadas, linfocitos T y macrófagos. Además los mediadores pro-inflamatorios (Histamina, leucotrienos, prostaglandinas), Las citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-13).¹⁷

Síntomas de la rinitis alérgica

Los alérgenos son principalmente pólenes de las plantas y los hongos estos son los que producen los síntomas de la rinitis como estornudos, congestión, catarro, prurito, de la nariz, garganta, ojos y oídos. Los síntomas aparecen tanto en niños como en adultos, siendo más frecuentes en los primeros.



Figura 3 síntomas de la rinitis alérgica.

http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/19316.htm

Mediadores bioquímicos de la respuesta alérgica y su relación con síntomas específicos.

<i>Histamina</i>	{	Prurito, estornudos, rinorrea, congestión nasal (Iniciales).
<i>Prostaglandinas</i>	{	Congestión nasal, (inicial), sibilancias, disnea.
<i>Leucotrienos</i>	{	Sibilancias, disnea.
<i>Triptasa</i>	{	Sibilancias, disnea.

Causas de la rinitis alérgica

En la gran mayoría de los casos, se cuenta con antecedentes alérgicos en general por una ó ambas ramas familiares, La R.A. tiene un carácter hereditario o genético bien definido. Más bien, lo que se hereda es la predisposición ó capacidad para crear alergias, de uno ú otro tipo. Sin embargo, eso no es todo, se necesita de la exposición repetitiva ó constante a partículas proteicas inhaladas ó ingeridas con características bioquímicas bien definidas, que llamamos alergenos, para que se "despierte" el fenómeno de alergia.

Entre los alergenos más frecuentes se encuentran los pólenes de zacates, de ciertos árboles, y de malezas; el polvo de casa, el epitelio (pelo) de animales, ácaros del polvo, esporas de hongos, partículas de insectos, ó inclusive algunos alimentos. La mayoría de los que padecen R.A. son alérgicos a muchos de estos alergenos.¹⁸

Tratamiento en la rinitis alérgica

Son tres las opciones a seguir en el tratamiento de los enfermos con la patología alérgica respiratoria producida por hongos al igual que la que causan otros aeroalergenos, la primera es tomar medidas de control ambiental, otra es farmacoterapia y finalmente la inmunoterapia específica

Las medidas de control ambiental, se encaminan a disminuir la inhalación de concentraciones de alergenos, mediante medidas higiénicas. Los hongos están ampliamente distribuidos en la naturaleza por lo que es muy difícil e imposible su evitación por completo. Sin embargo hay un cierto número de precauciones que se pueden tomar para minimizar el contacto con ellos. Dado que el crecimiento de los hongos se ve favorecido por la humedad elevada, la oscuridad y el acumulo de polvo y materiales orgánicos las principales medidas a tomar en cuenta son las siguientes.

- Evitar acercarse a vegetación muerta o en estado de descomposición y no mover montones de hojas caídas en el suelo.
- Evitar tener vegetación densa cerca de la vivienda. Se deben eliminar las hojas muertas y evitar el acumulo de restos orgánicos cerca de la casa (basureros, etc.).

- Eliminar la humedad y airear las zonas oscuras y húmedas de la casa, utilizando en ellas pintura antimohos y funguicidas en sitios que tengan tendencia a humedecerse.
- Evitar plantas de interior y flores secas de adorno.
- La cocina y el cuarto de baño, por sus condiciones de humedad y calor, favorecen el desarrollo de hongos, por ello deben ser aireados y limpiados con soluciones antifúngicas
- Evitar el almacenamiento de alimentos sobre todo de frutas y verduras.

Reacciones de hipersensibilidad tipo I Como modelo para conocer la fisiopatología de la Rinitis alérgica

También denominada hipersensibilidad mediada por IgE. Constituyen reacciones inflamatorias de instauración inmediata, aunque a veces semirretardada, causada por la liberación masiva de mediadores inflamatorios (histamina, triptasa, prostaglandinas y leucotrienos) por leucocitos basófilos y mastocitos, como consecuencia de la unión, por su extremo Fc., de anticuerpos IgE frente a determinados antígenos, en la membrana de dichas células.

Tales mediadores son los causantes de las manifestaciones clínicas, las cuales, según la vía de acceso y el grado de difusión intracorporal del alérgeno, pueden adoptar una forma localizada - como la rinitis o el asma.

La hipersensibilidad de tipo I se produce en dos etapas contiguas: **sensibilización** y **desencadenamiento**. En la etapa de sensibilización los anticuerpos IgE producidos en respuesta a un antígeno se unen a receptores de membrana de los mastocitos y/o basófilos. En la etapa de desencadenamiento, se reconocen, a su vez, dos fases, una **fase inicial** y una **fase tardía**. Figura 4

1. Sensibilización que comprende:

- **Producción de IgE** frente al primer contacto sensibilizante con el antígeno.
- **Unión de la IgE** a receptores específicos en la superficie de mastocitos y basófilos.

2. Desencadenamiento (donde se produce)

- **Reexposición al antígeno** e interacción del mismo con la IgE específica
- **Activación celular** y liberación de mediadores químicos.
- **Acción de los mediadores** sobre los diferentes tejidos.¹⁹

Reacción alérgica inflamatoria

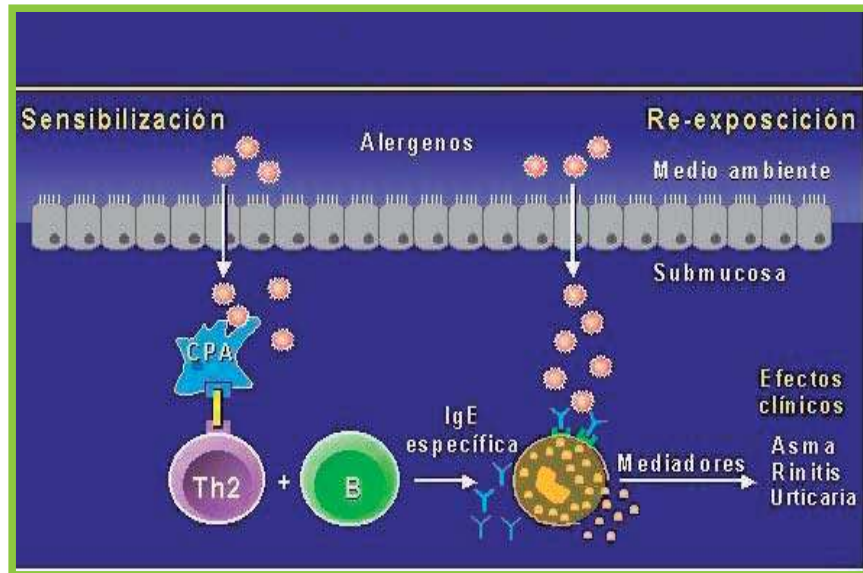


Figura 4 ETAPAS DE LA REACCIÓN ALÉRGICA

<http://congreso.med.unne.edu.ar/catedras/fisiologia1/ige.htm>

Cuando una persona susceptible se expone a un posible alérgeno, este es captado por unas células, denominadas células presentadoras de antígeno (CPA), que lo procesan y lo presentan a los linfocitos Th2, éstos a su vez interaccionan con los linfocitos B que son capaces de producir IgE específica para ese alérgeno. tal como se ilustra en la figura número 4.²⁰

La IgE se fija a la superficie de mastocitos y basófilos a través de los receptores de alta afinidad ($Fc\epsilon RI$) que poseen estas células en su membrana. Esta unión (IgE- $Fc\epsilon RI$) es monovalente y no induce señales al interior de célula. Por lo tanto, el acontecimiento necesario para poner en marcha la reacción de hipersensibilidad inmediata es la posterior unión del antígeno multivalente a la IgE de la superficie de los mastocitos y basófilos. Ante una posterior exposición del antígeno contra el cual algunos de estos anticuerpos reaccionan, se producirá el entrecruzamiento (**Figura 5**) y con ello la agregación de los $Fc\epsilon RI$ al que están

unidas esta agregación de los receptores va a ser lo que provoque la activación celular y la liberación de mediadores farmacológicos producidos por estas células al espacio extracelular dando lugar a la sintomatología alérgica característica.²¹

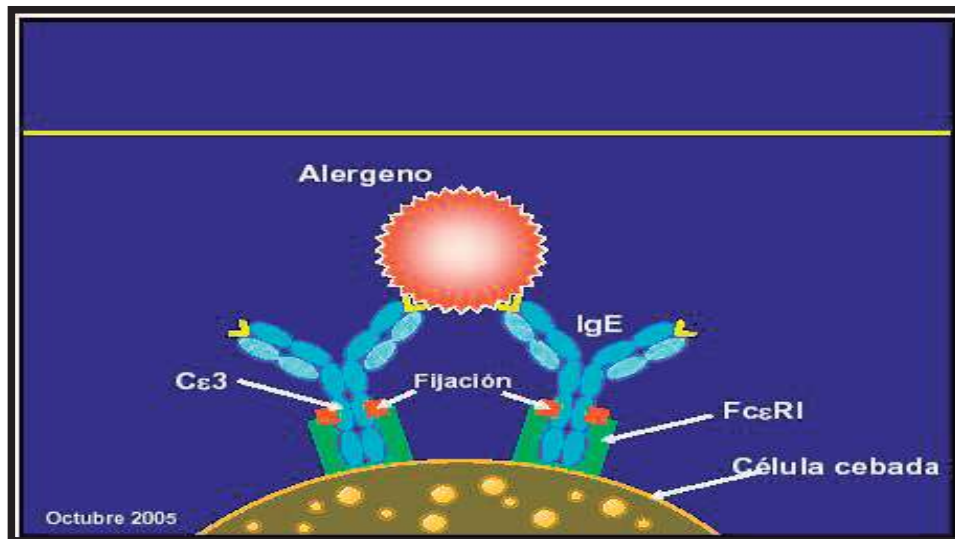


Figura 5 Entrecruzamiento de la IgE www.alergomurcia.com

Inmunoglobulina E (IgE)

Todas tienen una estructura básica de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. El isotipo de la inmunoglobulina se determina por el tipo de cadena pesada presente. La IgE fue la última inmunoglobulina descubierta. Es el isotipo de inmunoglobulina que contiene la cadena pesada ϵ (épsilon). Su concentración sérica y su vida media son las más bajas de todas las inmunoglobulinas normalmente presentes en el plasma en una concentración menor a $1\mu\text{g/mL}$. En situaciones patológicas, infecciones por helmintos y en la atopia grave, el nivel sérico puede aumentar por encima de $1000\mu\text{g/mL}$. La IgE posee receptores Fc en varias células del organismo, a través de los cuales mediante su unión o fijación es capaz de desencadenar la activación y consiguientes respuestas inmunológicas. (figura 6)

Estructura de la IgE

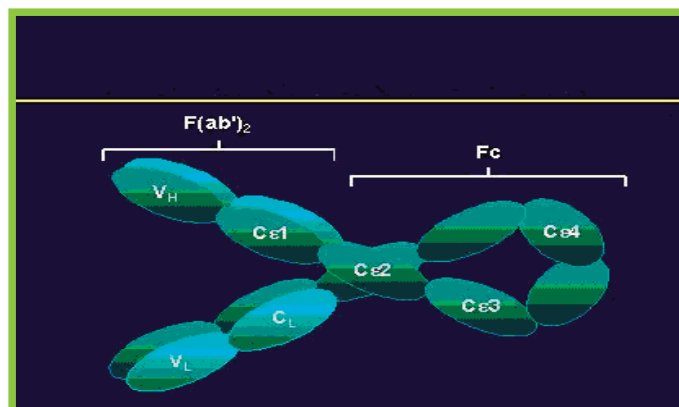


Figura 6 estructura de la inmunoglobulina E y sus sitios de unión

<http://congreso.med.unne.edu.ar/catedras/fisiologia1/ige.htm>

TABLA 1. DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES Fc DE LA IgE

Receptores Fc	Células efectoras
FcεRI (alta afinidad)	Basófilos y mastocitos
FcεRIIA (baja afinidad) (CD 23)	Linfocitos B
FcεRIIB (baja afinidad) (CD 23)	Eosinófilos, plaquetas, células dendríticas, linfocitos T activados.

Reino de los hongos

Los hongos constituyen un grupo numerosos de organismos (se ha descrito aproximadamente 500,000, pero se estima que pueden existir entre 1 y 1.5 millones de especies) que presentan una amplia distribución en la naturaleza, contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica y participando en los ciclos biológicos. Un pequeño número son patógenos de animales y plantas ²²

Pocos hongos son los patógenos obligados y muchos son oportunistas capaces de tomar ventaja de cualquier debilidad de las defensas del huésped excepción que tiene gran impacto en la economía y en la salud tanto animal como vegetal, y en el caso particular, en el bienestar del hombre

Características generales de los hongos

Los hongos son organismos eucariotas. Y lo que es más importante, poseen un núcleo rodeado de una membrana nuclear. A diferencia de las células vegetales y algunas bacterias, los hongos no contienen clorofila y no pueden sintetizar macromoléculas a partir de dióxido de carbono y la energía obtenida de las radiaciones luminosas. Por tanto todos los hongos tienen una existencia heterotrófica en la naturaleza, como saprofitos, simbioses, comensales o parásitos²³ La estructura de las células de los hongos es muy diferente de la de las bacterias que son organismos procariotas. Aunque comparten muchas estructuras, las células de los hongos se diferencian de las de la plantas en la composición de la pared celular. ²⁴

Los hongos pertenecen al reino *Fungi*, al estar desprovistos de clorofila necesitan de otras fuentes de compuestos orgánicos para nutrirse. Se desarrollan en estructuras filamentosas y se reproducen por esporas. Su estructura elemental es la hifa (forma tubular, pluricelular, con tabiques interiores generalmente) y el conjunto de hifas forma el micelio. Tienen gran capacidad mutagénica, pudiéndose presentar diversas formas de una misma especie, lo que complica su clasificación. Su composición alérgica puede variar entre la forma micelar y la espora,

dificultando su estandarización. Según su forma de reproducción se puede clasificar en:

- **Hongos perfectos:** reproducción sexual. Incluyen Mastigomicetos, Zigomicetos, Ascomicetos, Basidiomicetos.

- **Hongos imperfectos:** reproducción asexual. A estos pertenecen los Deuteromicetos, que incluyen los hongos de mayor interés alergológico.

Sus esporas son las partículas más abundantes en el aire, poseen un tamaño de 3-100 μm y tienen un papel muy importante por mantener el equilibrio ecológico, transformando los detritus de materiales orgánicos. En España los de mayor predominio son: *Cladosporium sp*, *Alternaria sp*, *Aspergillus sp*, y *Penicillium sp*. (Todos del grupo de los Deuteromicetos). *Alternaria* y *Cladosporium* son más frecuentes en ambientes externos, sobre plantas y en zonas putrefactas del suelo. *Aspergillus* y *Penicillium* crecen en graneros, almacenes, sótanos y ambientes domésticos (cocina, baños, armarios, paredes húmedas, bibliotecas, acondicionadores, alimentos, etc.); últimamente *Alternaria* está recibiendo importancia como hongo de interior. Los niveles de esporas se ven afectados por la temperatura, humedad y lluvia, siendo durante el verano y otoño cuando se encuentra el mayor número en el ambiente.

Pared celular

Por el exterior de la membrana citoplásmica, se encuentra la pared celular que esta compuesta fundamentalmente por polisacáridos y por diversas proteínas. Los polisacáridos más importantes son la quitina (polímero de n-acetil glucosamina), el manano (polímero de manosa) y el glucano (polímero de glucosa). En la tabla 2 se enumeran algunos de los polisacáridos más prevalentes

Tabla 2 Principales polisacáridos de la pared celular de los hongos

POLIMERO	MONOMERO	UNION Y ESTRUCTURA
Quitina	N-acetilglucosamina	β -1,4-polímero no ramificado largo
Quitosano	D-glucosamina	β -1,4-polímero no ramificado largo
Celulosa	D-glucosa	β -1,4-polímero no ramificado largo
β -glucano	D-glucosa	Estructura β -1,3 unida con enlaces β -1,6-en los puntos de ramificación
α -glucano	D-glucosa	α -1,3- y α -1,4-
Manano	D-manosa	Estructura α -unidas con frecuentes ramas α -1,2- y α -1,3-unida de uno a cinco residuos cada una

Morfología

Los hongos presentan básicamente dos tipos de morfología: una multicelular denominada filamentosa y otra unicelular denominada levaduriforme. Los hongos filamentosos (miceliares o mohos), representan el crecimiento más típico de los hongos microscópicos. En medios de cultivo sólido y también sobre cualquier superficie en la que se desarrollen, por ejemplo frutas u otros alimentos, producen colonias algodonosas o pulverulentas que son muy características.²⁵

Los hongos pueden ser causantes de la patología alérgica respiratoria, tanto en vías aéreas superiores como inferiores, en personas sensibles. Las esporas fúngicas se encuentran en el aire a concentraciones muy superiores a las de los pólenes y en muchos casos son más pequeñas que los granos de polen alcanzando así más fácil los bronquios pulmonares.²⁶

TABLA 3. Clasificación de los hongos alergénicos

Negros	<i>Alternaria, Cladosporium, Helminthosporium, Curvularia, Ulocladium, Drechlera.</i>
Hialino fungi imperfecti	<i>Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Scopulariopsis, Acremonium, Monilia.</i>
Mucorales	<i>Mucor, Rhizopus, Absidia.</i>
Levaduriformes	<i>Candida, Rhodotorula</i>
Basidiomicetos	<i>Puccinia graminis</i>

Algunos de los alérgenos fúngicos más importantes son

Alternaria alternata (= *A. Tenuis*): Alt a 1 de 25-50 Kd, presente tanto en la forma micelar como en la espora. *Cladosporium herbarum*: Cla h 1 de 13 Kd, presente tanto en la forma micelar como de espora. *Aspergillus fumigatus*: Asp f 1 de 18 Kd, principalmente en forma micelar. *Penicillium notatum*: alérgeno mayor de 68 Kd.²⁷

La reactividad cruzada entre diferentes hongos está poco estudiada, pero se cree que existe entre hongos filogenéticamente cercanos, los relacionados morfológicamente y entre especies del mismo género. Se ha comprobado con estudios *in vitro* la existencia de alérgenos comunes entre especies y géneros, como es el caso de la *A. alternata*, *C. herbarum* y *A. fumigatus*.

La exposición a los alérgenos fúngicos se produce tanto en espacios abiertos como interiores. Muchos de los alérgenos de interiores son los mismos que se encuentran en el exterior de los edificios, penetrando por ventanas y puertas, sistemas de ventilación o por grietas u otras aberturas en las paredes. Los hongos pueden también ser introducidos en los edificios a través de la tierra adherida en los zapatos. Algunas especies de hongos como *Penicillium* y *Aspergillus*, se encuentran en mayores concentraciones en el interior de los edificios que en el espacio abierto.

Las respuestas alérgicas a los hongos se relacionan de una manera más directa con las esporas fúngicas (estructura de reproducción del hongo).

La inhalación de esporas de hongos es la característica definitiva de provocar la reacción alérgica en pacientes inmunosuprimidos e individuos atópicos (relativo o

concerniente a una tendencia hereditaria a desarrollar reacciones alérgicas inmediatas, como asma, dermatitis atópica o rinitis alérgica). Los géneros de hongos oportunistas que causan principalmente estas enfermedades alérgicas son: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Helmintosporium*, *Absidia*, *Hormodendrum*, *Rhizopus*, y *Mucor*.²⁸

Antimicóticos

Dentro de los antimicóticos se encuentran los de acción sistémica y los de acción local o tópica (tabla 4), entre los primeros se dispone de Anfotericina B, un antibiótico macrólido poliénico cuya actividad antimicótica depende, cuando menos en parte, de su unión a la fracción esterol y en particular al ergosterol que esta en la membrana de los hongos sensibles. Por su interacción con esteroides de las membranas en los microorganismos, los polienos forman poros o conductos. El resultado es un incremento en la permeabilidad de la membrana que permite la salida de diversas moléculas pequeñas. Otros mecanismos de acción podrían incluir la lesión oxidativa de los hongos, cuando menos *in vitro*^{29, 30}

Los antimicóticos azólicos incluyen dos clases generales, los imidazoles (ketoconazol, econazol, butoconazol, oxiconazol, sulconazol y Bifonazol) y los triazoles (terconazol, itraconazol y fluconazol), ambos grupos se pueden utilizar por vía sistémica o local (Tabla 4). Estos comparten el mismo espectro y mecanismo de acción contra los hongos, siendo su principal efecto la inhibición de la esterol – 14-alfa-desmetilasa, que es un sistema de enzimas que dependen del citocromo P₄₅₀ de los microsomas. De esta manera, imidazoles y triazoles entorpecen la biosíntesis del ergosterol en la membrana citoplásmica y permiten la acumulación de los 14-alfa-metilesteroles³¹

Tabla 4. Antimicóticos tópicos y sistémicos

ANTIMICÓTICOS		
AZOLES		POLIENOS
a) Imidazoles	b) Triazoles	
		Anfotericina B (i.v)
Ketoconazol (oral)	Terconazol	
Econazol (tópica)	Itraconazol (oral)	Nistatina (tópica)
Butoconazol	Fluconazol (oral, i.v.)	
Oxiconazol		
Sulconazol		
Bifonazol (tópica)		
Isoconazol		
Miconazol		
Clotrimazol		

El uso de la Anfotericina B mostró efectividad y durante mucho tiempo fue la única droga disponible para terapia de las micosis sistémicas, pero sus efectos secundarios principalmente la nefrotoxicidad limitó su uso. El desarrollo de los azoles comienza con el Ketoconazol siendo el primer antimicótico oral para infecciones sistémicas. Posteriormente vendrían los triazoles de primera generación, Fluconazol e itraconazol, que representaron el segundo gran avance en el tratamiento de la infecciones micóticas, con un mejor perfil de seguridad mejor que la Anfotericina B y el Ketoconazol. Sin embargo, el desarrollo de resistencia, toxicidad, las interacciones medicamentosas y su espectro sub- óptimo para las micosis emergentes, hicieron necesarias nuevas investigaciones. Esto llevo al desarrollo de triazoles de segunda generación: Voriconazol, Posaconazol, Ravuconazol y Albaconazol.

Resistencia a los antifúngicos

La sensibilidad de los antifúngicos nos permite conocer mejor la situación actual de los fármacos, tanto de las levaduras como de los hongos filamentosos. La resistencia intrínseca debe entenderse como la ausencia de sensibilidad de una determinada especie hacia un determinado antifúngico.

La resistencia primaria es la que presenta determinada cepa de una especie a un antifúngico de forma natural (sin exposición previa), mientras que la resistencia secundaria es la adquirida como resultado del contacto con el hongo con esa sustancia.

Entre los mecanismos bioquímicos implicados en el desarrollo de resistencia a los antifúngicos, se incluyen las alteraciones de la membrana celular, los defectos enzimáticos, el aumento de la síntesis de compuestos que compiten con el antifúngico y las alteraciones en las estructuras diana o blanco³²

Generalidades de *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis (Bt), es una bacteria Gram – positiva, móvil, aerobia estricta, pertenece al genero *Bacillus*, morfológicamente relacionada con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*. Estas tres especies bacterianas, durante su ciclo de vida, presentan dos fases Principales, la fase de crecimiento vegetativo en donde las bacterias se duplican por bipartición cada 30 o 90 min. Dependiendo del medio de cultivo y la fase de esporulación.

Bt es considerada una bacteria ubicua ya que se ha aislado de varias partes del mundo y de muy diversos sistemas como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. A Bt se le diferencia de *B. cereus* y *B. anthracis* por contener un cuerpo paraesporal conocido como cristal (**Figura 7**), el cual es de naturaleza protéica y tiene propiedades insecticidas. Esta constituido por proteínas denominadas delta-endotoxinas también conocidas como proteínas Cry y Cyt. Se han encontrado delta-endotoxina activa contra insectos lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y también contra otros invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoarios. La primera bacteria fue aislada del gusano de la seda en 1902. Durante muchos años se pensó que Bt era un patógeno de lepidópteros por que solo se aislaron cepas activas contra este tipo de insectos. En 1978, se encontró una bacteria Bt sub especie *Israeliensis* capaz de matar mosquitos y en 1983 una de Bt sub especie *tenebrionis* activa contra insectos coleópteros. A partir de entonces un gran número de investigadores de todo el mundo se ha dedicado a

buscar más de estas bacterias y se han encontrado una gran diversidad de estas, las cuales se han caracterizado por su serotipo H-flagelar o sea por las proteínas presentes en el flagelo en más de 45 serotipos y 58 serovariedades diferentes.³³

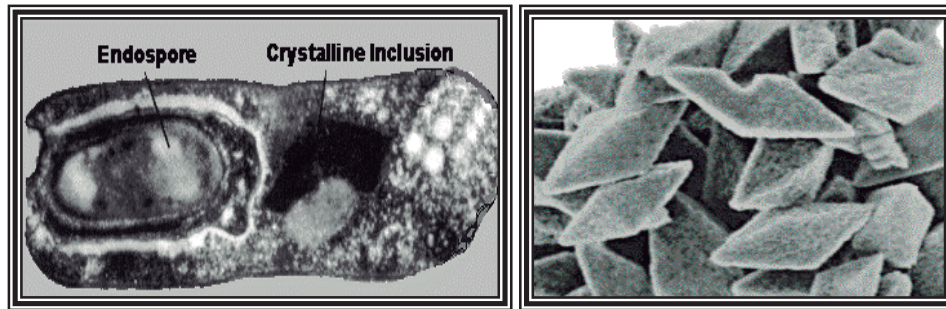


Figura 7. δ -endotoxinas, en forma de cristales (proteínas Cry y Cyt).

Poco se sabe sobre el habitat natural de Bt sin embargo dado su requerimiento vitamínico y de algunos aminoácidos como ácido glutámico, así como de su actividad bioinsecticida, se piensa que la forma de vida vegetativa solo se presenta en el interior de los insectos que infecta hasta que esporula y es liberado al medio ambiente donde permanece en forma de esporas, lo que explica su amplia distribución.³³

Las diferentes variedades de Bt pueden intercambiar fácilmente sus plásmidos mediante un proceso semejante a la conjugación, fenómeno que ha sido demostrado en el intestino de larvas de mosquito. De este modo, las variedades de Bt pueden también intercambiar plasmidos que contienen genes de delta-endotoxina (los genes cry), y así aumentar su espectro de acción contra más especies de insectos.^{34, 35,36}

Toxinas de *Bacillus thuringiensis*

Heimpel en 1967, considero tres exotoxinas y una endotoxina, esta ultima es la responsable del efecto insecticida.

Existen diferentes tipos de delta endotoxinas y cada una de ellas se asocia a un grupo determinado de insectos. Sus pesos moleculares varían entre 72 y 135 Kilodaltons y su composición es proteínica por lo cual se desnaturalizan con el calor y son solubles en condiciones alcalinas.³⁷

CLASIFICACION.

La genética molécula permitió la clasificación de Bt, ya que se demostró que los genes que codifican para la toxina cristal, los cuales están localizados en plásmidos, tienen una correlación estrecha con la toxicidad fenotípica. La clasificación por antígenos flagelares aún es útil, y hasta el momento se han logrado identificar 55 serotipos. Esta clasificación no permite correlacionar la cepa con la actividad patogénica, la cual esta determinada por el tipo de delta-endotoxina. Existen dos clasificaciones una basada en su similitud de secuencia de aminoácidos y el rango de especificidad y que fue propuesta por Hofte y Whiteley en 1989.³⁷ En 1998, Schnepf y colaboradores propusieron una clasificación basada en la similitud de secuencias primaria entre las proteínas Cry.

Las clases en base a su similitud en la secuencia nucleotídica y en el espectro insecticida de la proteína que codifican, ya que el patotipo de una determinada cepa de Bt es el reflejo de gen o genes que expresa. Estos genes se dividen en varias clases en base a su similitud en la secuencia nucleotídica y en el espectro insecticida de la proteína que codifican.

Tabla 5 clasificación de las proteínas Cry

GEN	ESPECIFICIDAD	FORMA DEL CRISTAL	MEDIDA DE LA PROTEINA
Cry I	Lepidópteros	Bipiramidal	130-138 kDa
Cry II	Lepidópteros y dípteros	Cuboidal	69-71 kDa
Cry III	Coleopteros	Irregular	73-74 kDa
Cry IV	Dípteros	Bipiramidal	73-134 kDa

<http://www.ippc.orst.edu/dir/microbial/bt/&h=208&w=268&sz=29&tbnid=fk4Ds37>

DOMINIOS DE LA δ -ENDOTOXINA

Esta proteína tiene 3 dominios:

- * Dominio I (N-ter, 220 residuos): Es el dominio formador del canal. Es un complejo de 7 hélices, donde una de ellas (la hélice 5) está rodeada por las otras 6. Las 6 hélices son anfipáticas y suficientemente largas para atravesar la bicapa lipídica de la membrana de la célula del intestino medio del insecto.
- * Dominio II (central, 200 residuos): Es el dominio que determina la especificidad, mediante la unión con el receptor de membrana de las células del intestino medio.
- + Dominio III (C-ter, 150 residuos): Está menos definida funcionalmente, pero se piensa que transduce información desde el dominio II (de unión al receptor) hasta el dominio I (dominio de formación del canal). Además, parece que regula la actividad del canal, estabiliza la toxina y funciona junto al dominio II en la formación del canal.

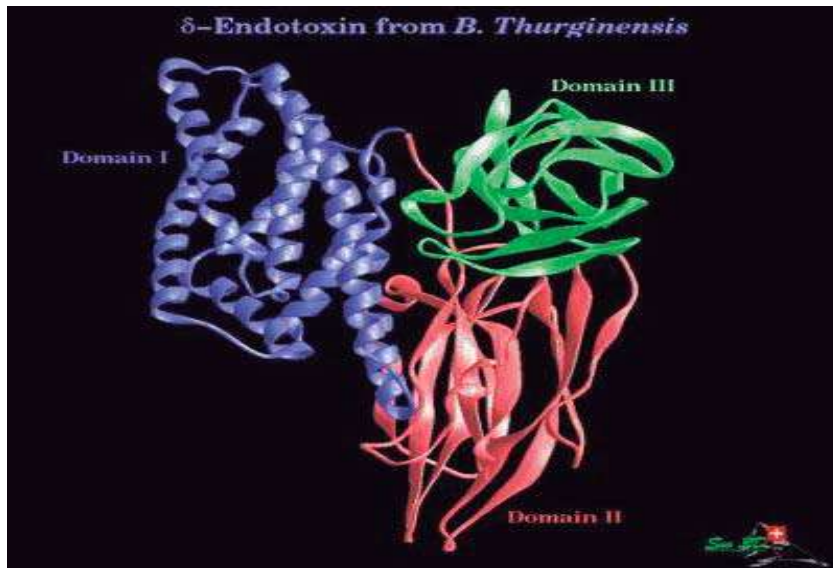


Figura 8. Dominios de la protoxina Cry 1Ac de *Bacillus thuringiensis*.

<http://images.google.com.mx/imgres?imgurl=http://www.ippc.orst.edu/dir/microbial/bt/crystal.gif&imgrefurl=http://www.ippc.orst.edu/dir/microbial/bt/&h=208&w=268&sz=29&tbnid=fk4Ds37>

Soberon, Rausell, pardo han identificado dos receptores para la toxina Cry 1A en insectos lepidópteros: una caderina (BtR1) y una aminopeptidasa N (APN). Y proponen que los receptores de las toxinas Cry tienen una función secuencial en la toxicidad y presentan un modelo del mecanismo de acción que integra la participación de ambos receptores. La unión esta dada por cambios conformacionales de la toxina.³⁸

La toxina interacciona con Bt R1 e induce un corte proteolítico en la toxina y la formación de un oligómero de cuatro subunidades.

- ⇒ El cambio oligomérico esta acoplado a un incremento de 200 veces en la afinidad hacia el segundo receptor, APN
- ⇒ La APN tiene un papel importante en dirigir al oligómero a los microdominios de membrana en donde la toxina se inserta para la formación de un canal iónico

El oligómero de la toxina es el que tiene la capacidad de inserción en la membrana.

Además el pH alto del intestino larvario promueve un cambio conformacional adicional en el dominio I³⁸

La especificidad por la delta endotoxina a un tipo de insecto en particular implica la presencia de receptores específicos, la toxina se inserta en forma irreversible en la membrana plasmática de las células intestinales y próximo paso es la formación de poro o lesión en esta membrana que conduce a una variación en su permeabilidad, alterando el transporte de los iones de potasio, lo cual trae como consecuencia la lisis celular, disrupción de la integridad del intestino y la muerte del insecto. Por otra parte, las esporas bacterianas se multiplican en la hemolinfa y provocan una septicemia que incrementa el efecto de las toxinas insecticidas.³⁹

MODO DE ACCIÓN DE LAS DELTA-ENDOTOXINAS DE

B.thuringiensis

El primer paso del ciclo de infección a partir de la ingestión del cristal parasporal de *B.thuringiensis* (Bt) es la solubilización de las proteínas de los cristales en el ambiente alcalino (pH de 7,5-8) del intestino del insecto en proteínas de 130-140 KDa. La eficiencia de la solubilización del cristal proteico depende del ambiente del intestino del insecto y de la composición del cristal.

En un segundo paso, se da una proteólisis de la proteína por las proteasas del intestino, dando lugar a la toxina propiamente dicha, de 60-65 KDa. Esta proteína activada difunde a través de la membrana peritrófica, que es impermeable a las protoxinas de 130-140 KDa, así que actúa como un filtro molecular.

En el tercer paso, la toxina se une a receptores específicos localizados en el intestino medio del insecto. Esto provoca la formación de poros conductores de cationes de 10-20Å de diámetro y la destrucción consecuente de los gradientes de iones. Como consecuencia, un flujo de agua acompaña a la entrada de iones a la célula, ésta se infla y lisa.

La ausencia de regulación iónica causa también una parálisis en los músculos del intestino y de partes de la boca, con lo que la larva para de comer y finalmente muere.

Los poros creados, además, permiten que las células vegetativas de *B.thuringiensis* germinadas a partir de las esporas migren a la hemolinfa y promuevan el proceso de intoxicación por bacteremia.³⁹

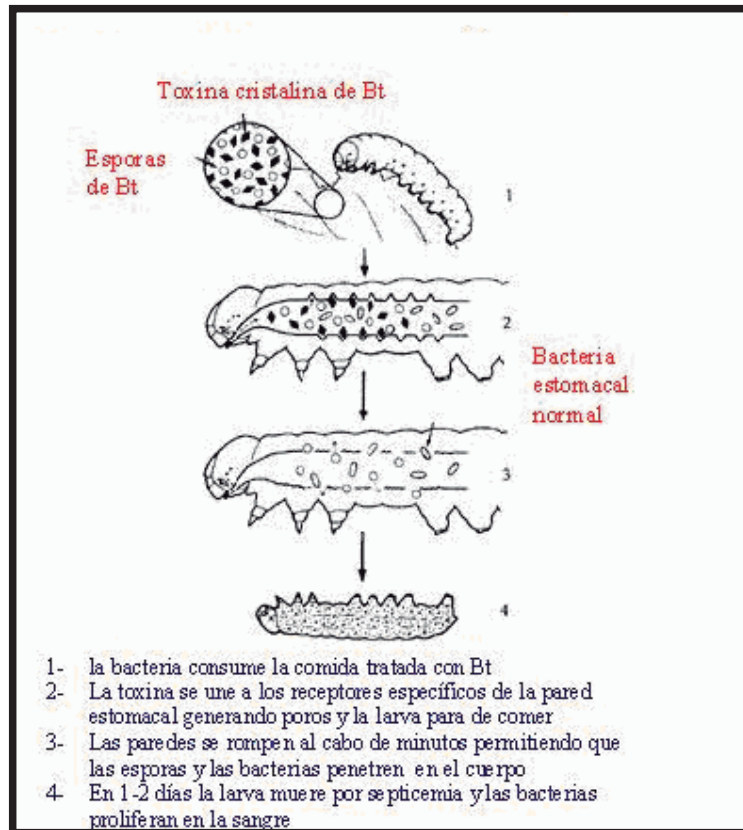


Figura 9: Modo de acción de la toxina de *Bacillus thuringiensis*.⁴⁰

El medio de fermentación debe contener una fuente de carbono, de nitrógeno orgánico y sales minerales que en balance estimulen el crecimiento, la esporulación y la producción de cristales altamente tóxicos. En términos del tipo de constituyentes, la fuente de carbono (C) orgánica más empleadas son: la glucosa, el almidón y sacarosa, reconocidas como esenciales para la síntesis de cristales

La síntesis de bioinsecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*, es un proceso que requiere de medios de fermentación o de cultivo elaborados con materias primas de bajo costo, pero que no afecte su calidad tóxica; el diseño de un medio de cultivo para la síntesis de la delta-endotoxina se logra mediante la combinación inteligente de fuente de carbono, nitrógeno y minerales, este medio de cultivo no necesariamente será el mismo para otras variedades o aislados de la bacteria,

pues Bth sintetiza cristales diferentes en forma, tamaño y toxicidad, en función del medio de cultivo y la variedad utilizada.⁴¹

USOS Y APLICACIONES

Cry 1Ac ha sido ampliamente utilizado en la agricultura en el control biológico para combatir las plagas. Se han encontrado delta endotoxinas activas contra insectos lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y también contra otros invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoarios.³³

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Rodríguez Orozco y colaboradores en el 2005 realizaron un trabajo el cual se encaminó a examinar el efecto de Cry 1Ac por medio de la activación de monocitos y neutrófilos humanos "*in Vitro*" se determinó la cinética y magnitud de la explosión oxidativa celular en monocitos y neutrófilos tratados con Cry1Ac, los resultados indican que Cry 1Ac induce la explosión oxidativa en monocitos y neutrófilos humanos, este efecto fue máximo a los 8 minutos postincubación para ambos tipos de células presentándose en monocitos un efecto mayor. Hace poco se demostró que los fagocitos profesionales y, en particular, los monocitos eran un blanco celular importante para explicar los efectos inmunogénicos y coadyuvantes de Cry 1Ac, se determinó que Cry 1Ac ejerce una potente activación y proliferación de monocitos, lo que esta en relación con un incremento de los sucesos de procesamiento y presentación de antígenos por esta célula ^{42,43}

La respuesta mayor fue a las 70 horas en los monocitos tratados con Cry 1Ac a una concentración de 7.8 µg/mL a comparación de los monocitos no tratados con Cry 1Ac (P < 0.01).⁴²

Por lo tanto los monocitos son las células blanco mas importantes para este efecto, y Cry1Ac activa la fagocitosis en células fagocíticas humanas, así que podría ser útil para tratar inmunodeficiencias e infecciones recurrentes. Hecho que hace trascendente el estudio y experimentación con esta importante toxina debido

a estos hechos científicos creemos que es considerable el impacto de esta toxina tanto en el área clínica como micológica.

Varios investigadores coinciden que Cry 1Ac tiene toxicidad selectiva contra insectos y es inocua en mamíferos, y que se ha demostrado que es inmunógeno y adyuvante tan potente como la toxina del cólera que es el adyuvante de mucosas patrón.⁴⁴

Las características bioquímicas de la toxina como elevado peso molecular, alta resistencia a la proteólisis, solubilidad y estabilidad a pH extremos comunes con proteínas muy inmunogénicas hacen a ésta un posible candidato para el desarrollo de transportadores de epítopes de vacunas y sus propiedades adyuvantes fueron demostradas con el antígeno de superficie de la hepatitis B en ratones Balb/C., al encontrar que aumentaba el título de anticuerpos contra el antígeno de superficie de hepatitis B cuando se coadministraba con éste³⁹

JUSTIFICACIÓN

Los problemas de seguridad y toxicidad de los fármacos antifúngicos (principalmente de los polienos Anfotericina B y Nistatina), o de aparición de resistencias microbiológicas (sobre todo a Fluconazol) hacen imprescindible el desarrollo de nuevos antifúngicos que aporten unas ventajas apreciables respecto a los existentes.

Se ha observado que los sobrenadantes obtenidos de cultivos de células mononucleadas activada por la toxina Cry 1Ac del *Bacillus thuringiensis* han presentado efectos de inhibición en enterobacterias, lo cual despierta la inquietud por experimentar el efecto de la toxina en hongos alergénicos.

HIPÓTESIS

La toxina Cry 1Ac ejerce efecto fúngida sobre cepas de hongos alergénicos.

OBJETIVOS:

Objetivo general:

Determinar el efecto fungicida de la toxina Cry 1Ac de *Bacillus thuringiensis* sobre en hongos alergénicos.

Objetivos específicos:

1. Mantener cepario de hongos alergénicos aislados de exudado nasal de pacientes con diagnostico de rinitis alérgica.
2. Identificar la morfología macroscópica y microscópica de las cepas de hongos alergénicos aislados de exudado nasal
3. Evaluar el posible efecto fungicida de los sobrenadantes de cultivos de células mononucleadas en cepas de hongos alergénicos aislados de exudado nasal, mediante la técnica de Kirby Bauer

MATERIAL Y MÉTODOS

Recuperación de cepas de hongos alergénicos aislados de exudados nasales. Biotipificados por equipo Biolog

La recuperación de las cepas fúngicas se realizó inoculando colonias de los hongos en solución salina y una vez transcurridas 48 horas, fueron sembrados en cajas Petri con medio de cultivo sólido agar papa dextrosa,(PDA) por sembrado masivo. Las condiciones de cultivo fueron a temperatura ambiente, durante cinco días. Finalmente se observó la morfología macroscópica y microscópica.

a) Morfología Macroscópica

Forma y tamaño

Color en la superficie y/o en el reverso

Difusión del pigmento

Coloración

Textura

Superficie

Aspecto

Consistencia

Rapidez de crecimiento

b) Morfología Microscópica

Talo

Grosor

Presencia o ausencia de septos

Número de núcleos

Aparato conidiógeno

Estructuras donde se forman

Técnica de Microcultivo en portaobjetos.

Procedimiento.

- Se colocó un trozo de papel filtro o gasa sobre el fondo de una placa de Petri estéril. Se colocó un par de varillas de vidrio delgadas o de madera separadas a una longitud apropiada para que entren a la placa de petri, encima del papel de filtro; estas funcionarán como apoyo del portaobjetos de vidrio de 76x26 mm.

- Se colocó un cilindro de agar dextrosa papa sobre la superficie del portaobjetos. Pueden colocarse dos cilindros separados alrededor de 2,5 cm. entre sí, sobre el mismo portaobjeto si se desea más de un preparado.

- Se inoculó el cilindro de agar en tres o cuatro lugares con una pequeña porción de la colonia a estudiar, mediante un asa recta o la punta de aguja de disección.

- Se calentó un cubreobjeto con suavidad, pasándolo con rapidez por la llama del mechero de Bunsen y se colocó de inmediato directamente sobre la superficie de cilindro de agar inoculado. El calentamiento del cubreobjeto proporciona una

unión hermética entre su cara inferior y la superficie del agar, que se funde en forma ligera por el vidrio caliente.

- Se depositó con la pipeta una pequeña cantidad de agua en la base de la placa Petri suficiente para humedecer el papel o la gasa. Se tapó la caja e incubó el conjunto a temperatura ambiente (28°C) durante 3 a 5 días.
- Cuando el desarrollo fue suficiente a la vista se retiró con suavidad el cubreobjeto de la superficie del cilindro de agar con un par de pinzas, con cuidado para no romper el micelio adherente a la cara inferior del cubreobjeto más de lo necesario.
- Se colocó el cubreobjeto sobre una pequeña gota de azul de lactofenol aplicada a la superficie del cubreobjetos de 76x26 mm. El preparado se conservó para estudios adicionales sellando los bordes del cubreobjetos con el líquido de montaje o esmalte de uñas transparente. Esta actividad se realizó bajo una campana de seguridad biológica.
- Después de que se extrajo el cubreobjeto del cilindro (o cilindros) de agar, el bloque de agar puede separarse, para ello, se le despegó del portaobjeto con un palillo de madera. Esta operación se realizó sobre un recipiente con algún líquido de descontaminación como fenol al 5%, sobre el cual se dejan caer los trozos de agar. El micelio adherente a la superficie del portaobjeto original, después de eliminar el agar, se tiñó con azul de lactofenol y tapó con un cubreobjeto, para obtener un segundo preparado.

Técnica de microcultivo mediante el uso de membrana.

Procedimiento.

Las membranas de papel celofán se lavaron con agua destilada durante 10 minutos, posteriormente se envolvieron con papel aluminio y se llevaron a esterilizar a 121°C/15 min.

Las membranas de papel celofán se impregnaron con solución salina fisiológica estéril, al momento de colocarlas sobre la superficie del medio PDA en caja Petri, posteriormente se depositó una muestra del hongo en el centro de la placa.

Las placas se incubaron a 28°C durante una semana.

Una vez que se obtuvo el crecimiento fúngico necesario sobre la membrana, ésta se retiró de la superficie del medio con ayuda de unas pinzas de disección.

Posteriormente se realizó un corte de 1.5 cm² de esta membrana y se colocó sobre un portaobjetos de 76 x 26 mm, al cual se le añadió una gota de azul de lactofenol. Es importante tomar una muestra donde se observe un crecimiento uniforme y no tan abultado.

La laminilla se dejó pasar suavemente al calor, para permitir que el colorante penetre en las estructuras fúngicas, se coloca un cubreobjetos de 22 x 22 mm. y se sella con barniz transparente.

Por último, se observó al microscopio óptico a 10x y 40x.

* Se utilizaron soluciones desinfectantes como: alcohol 70% y Cloro. El trabajo se realizó bajo campana de bioseguridad (flujo laminar).

Obtención de células mononucleadas

1.-Preparación RPMI - 1640. Se depositó el contenido del sobre (medio) en un litro de agua bidestilada estéril, posteriormente agregar 2 mg de bicarbonato de sodio y 40 µL de antibiótico (gentamicina)

2.- Preparación del suero fetal bovino: en un tubo cónico Cornig de 50 mL agregar el suero necesario e inactivar en baño maría a 55°C durante media hora

3.-Aislamiento de las células mononucleadas mediante el método de Ficoll – Hypaque (gradiente de densidad 1.077)

Se extrajeron 10 mL de sangre periférica por punción venosa de dos voluntarios sanos.

La sangre se mantuvo en una solución 1:1 con medio RPMI 1640 con SFB al 10% (*Solución 1*).

Se depositaron 10 mL de Ficoll en un tubo cónico Corning de centrifuga y añadir 20 mL de la *solución 1* suavemente por las paredes del tubo.

Centrifugar el tubo a 1500 rpm a 4 °C/30 min.

Posteriormente con ayuda de una pipeta Pasteur, se obtuvo el anillo de la interfase donde se encuentran linfocitos B y T, monocitos y células NK, estas células se depositaron en un tubo cónico de 50 mL.

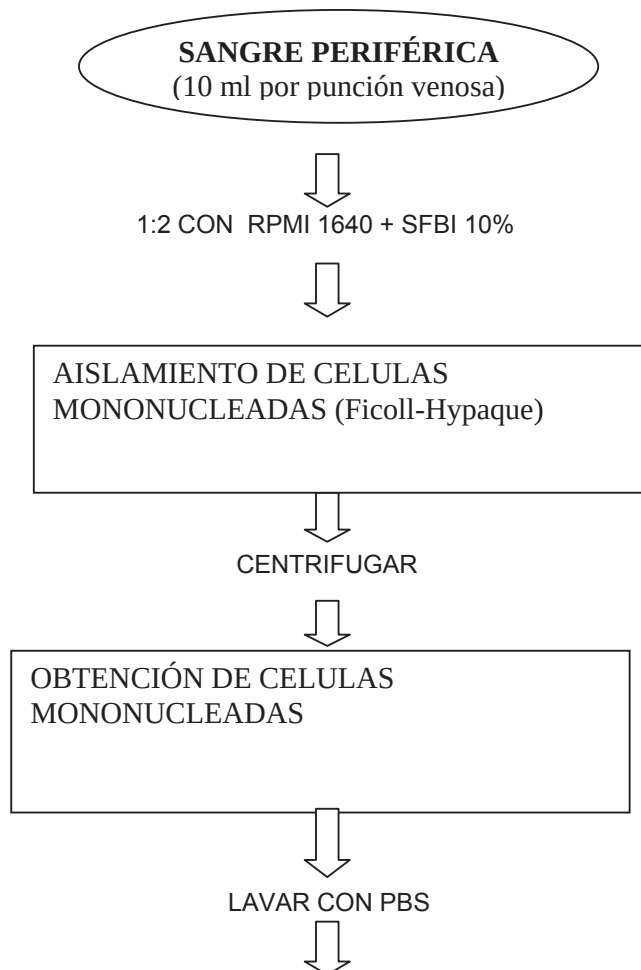
Se utilizó una solución de PBS para lavar las células mononucleadas y a 2500 rpm, 37 °C/15 min.

Por último se resuspendió el pellet en **RPMI 1640** mas **SFBI** al 10%.

Se midió la viabilidad celular con azul de tripano en cámara de Neubauer ésta se consideró permisible cuando fué mayor al 95 %

Se ajustaron las células 2×10^5 /pozo.

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA OBTENCION DE SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE CELULAS MONONUCLEARES.



MEDICIÓN VIABILIDAD CON AZUL DE TRIPANO EN CAMARA DE NEUBAUER
(Ajustar células 1×10^6 / ml, variabilidad permisible mayor a 92%)



Estimulación con Cry 1Ac de cultivos celulares 72 horas



Recolección de sobrenadantes



Evaluación del efecto fungicida de Cry 1Ac en cepas de hongos alergénicos

Obtención de Sobrenadantes de Cultivo de Células Mononucleares Humanas Activadas por Cry 1Ac.

En placas de 96 pocillos de fondo redondo, se depositan por triple seriado con cada una de las diferentes diluciones:

Tabla 6 diluciones de la protoxina Cry 1Ac en cultivos de células mononucleadas

<i>Control (+)con toxina</i>	<i>Control (-) sin toxina</i>	<i>Toxina pura</i>	<i>1:2</i>	<i>1:4</i>	<i>1:8</i>	<i>1:16</i>	<i>1:32</i>	<i>1:64</i>	<i>1:128</i>

El control negativo. Se depositó 120µl de RPMI más SFBI 10% y 100µl de células 2×10^5 /pozo.

El control positivo. Se depositó 80µl de RPMI mas SFBI al 10%, 100µl de células 2×10^5 /pozo, **40µl de PHA (fitohemaglutinina).**

- Los cultivos se mantuvieron 72 hrs. y al cabo de ese tiempo se transfirió el contenido de cada pozo de los tres triplicados en un tubo Eppendorf y se centrifugarán 15 min. a 7500 rpm.

- Se extrajeron los sobrenadantes con micropipetas y se congelaron a -20°C en alícuotas debidamente rotuladas para su uso en bioensayos (fungigramas).

- Esta metodología se realizó bajo campana de flujo laminar previamente sanitizada con alcohol al 70% y se trabajo con mechero de bunsen, bata, guantes y cubre bocas, esto es con el fin de obtener precisión y exactitud en los procedimientos, y como medidas de seguridad personal.

Pruebas de sensibilidad

Al igual que con las bacterias y los antibacterianos en este método se estudia la sensibilidad de los hongos filamentosos, Por difusión de la protoxina *Cry 1Ac* a diferentes concentraciones en medio sólido y utilizando como control positivo (Anfotericina B) y un antagonico como el fluconazol (control negativo).⁴⁴

Las pruebas de sensibilidad (fungigramas) se realizaron por el método de difusión en agar, método estandarizado a nivel internacional, y propuesto por el Comité Norteamericano de Estándares de Laboratorios Clínicos (NCCLS) para el estudio de sensibilidad antifúngica en hongos filamentosos método M38-P⁴⁵

La difusión en agar consiste en la difusión desde el disco, se forma un gradiente de concentración del antifúngico y la proliferación del hongo de prueba se inhibe a una distancia del disco.⁴⁶

Se usó la técnica Kirby Bauer para la evaluación de los halos de inhibición los cuales están íntimamente relacionados con la concentración mínima inhibitoria (CIM). En base al Comité Norte Americano de Estándares en Laboratorios Clínicos (NCCLS) Los resultados se interpretaron como:

Sensible, (S).

Sensibles dependiente de la dosis, (S-DD).

Resistente, (R).

- La categoría sensible no lleva implícito el éxito terapéutico.
- La categoría de resistente se correlaciona con fracaso terapéutico.
- La categoría S-DD ⁴⁶

Se informaron diámetros de inhibición

RESULTADOS

Identificación macroscópica y microscópica de hongos



A). *Aspergillus sp.*

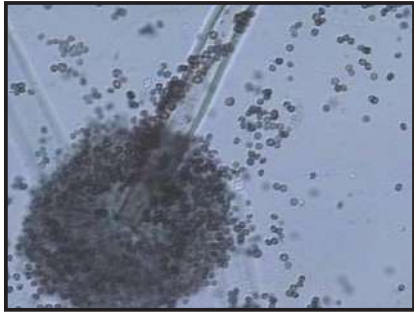
Colonias de crecimiento rápido, planas, vellosas, compactas, blancas al comienzo, toman rápidamente un color verde grisáceo, de aspecto aterciopelado y consistente. La superficie muestra algunos pliegues y mechones vellosos blancos. Dorso incoloro que, al envejecer, toma tintes amarillos o pardos. Su crecimiento es más rápido a 37°C.



B). *Cladosporium sp.*

Colonias de crecimiento lento, planas, finamente vellosas, aterciopeladas o lampiñas, de color blanco.

Identificación microscópica de hongos



A). *Aspergillus sp.*

Hongo filamentoso con conidioforos cortos, de pared lisa, incoloros o ligeramente verdosos, sin tabicar o sin ramificaciones. Nacen en una célula base del micelio, ensanchando al final con una vesícula amplia, coronada de esterigmas en forma de redoma. Esterigmas de una sola serie que nacen de la zona media de la cúpula vesicular y cubren parcialmente la superficie de la vesícula. Conidios verdes oscuros, unicelulares, redondos o seudoesféricos formando cadenas largas que no se ramifican y permanecen unidos formando columnas.



B). *Alternaria sp.*

Hongo filamentoso con conidióforos simples, tabicados, en cuyo extremo se forman unos conidios muriformes, de color pardo, con septos transversales y verticales de disposición irregular. Por gemación de la célula apical se genera un nuevo conidio, formándose largas cadenas de 10 o más conidios.

VALORACIÓN DEL EFECTO DE LA PROTOXINA Cry 1Ac SOBRE EL CRECIMIENTO DE HONGOS ALERGÉNICOS



A). *Alternaria sp.*



B). *Absidia sp.*

La prueba se realizó por difusión de la protoxina Cry 1Ac a diferentes concentraciones en medio sólido agar papa dextrosa. Se utilizó como control positivo (Anfotericina B) y Fluconazol como control negativo. Se obtuvieron halos de inhibición. La inhibición del crecimiento fúngico, se constató luego de la lectura de los halos de inhibición con concentraciones de 500µg/mL, 31.25µg/mL, 15.62µg/mL, 7.81µg/mL, 3.91µg/mL. Se obtuvo la inhibición del crecimiento en los hongos *Alternaria sp.*, *Absidia sp.* y *Eupenicillium sp.* La inhibición más significativa para *Alternaria sp.* con 2 mm de diámetro a una concentración de 31.25 µg/mL. En *Absidia sp.* la inhibición mayor fue de 2 mm de diámetro a una concentración de 500µg/mL. *Eupenicillium* presentó un halo de inhibición de 2mm de diámetro al igual que los anteriores. El diámetro de inhibición representativo en los tres hongos fue de 2mm de diámetro y las concentraciones variaron como se presenta en la tabla 7

Ensayo de sensibilidad en *Absidia sp.*

- A) Control positivo. Anfotericina B. B) Control negativo. Fluconazol.
- C) Efecto inhibidor de la protoxina Cry 1Ac a [500 mg/mL]

Tabla 7 sensibilidad de la protoxina Cry 1Ac sobre el crecimiento de hongos alergénicos

			Concentraciones de Cry1Ac en µg/mL					
HONGO	C+	C-	Pura 500	62.5	31.25	15.62	7.81	3.91
<i>Alternaria</i> sp	1.5 mm	R	0.5 mm	R	2 mm	1mm	1.5 mm	1.5 mm
<i>Absidia</i> sp.	2 mm	R	2 mm	R	R	R	R	R
<i>Aspergillus</i> sp.	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Cladosporium</i> sp	5 mm	R	R	R	R	R	R	R
<i>Eupenicillium</i> sp.	5 mm	3 mm	2 mm	R	R	R	R	R
<i>Fusarium</i> sp.	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Penicillium</i> sp.	R	R	R	R	R	R	R	R
C+ Control positivo Anfotericina B. 50 mg			R = resistente					
C- Control negativo Fluconazol 2 mg/mL			Sensibilidad en mm					

Las cepas fúngicas se biotipificaron por equipo **Biolog**, identificando los siguientes géneros: *Absidia* sp, *Aspergillus* sp, *Alternaria* sp, *Penicillium* sp, *Eupenicillium* sp, *Fusarium* sp, y *Cladosporium* sp.

Se realizó la identificación macroscópica y microscópica (tinción azul de lactofenol) encontrando una relación del 100% con los biotipificados por equipo **Biolog**.

En las pruebas de sensibilidad: los sobrenadantes (discos con 20µL) no presentaron inhibición frente a las cepas de hongos alergénicos.

La protoxina Cry 1Ac pura a una concentración de 500µg/mL, impregnando con 20 µL/disco. Inhibió el crecimiento de *Absidia* sp, presentándose un halo de inhibición de 4mm igual al obtenido con Anfotericina B de 50mg/mL (control positivo) que también tuvo 4mm en su halo de inhibición.

OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA Cry 1Ac

Cry 1Ac recombinante, fue Clonada de *Escherichia coli* y expresada en un factor de inducción IPTG y donada por el doctor Benito Pereira de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La realización de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) Permitió evaluar la pureza del producto recombinante obtenido.

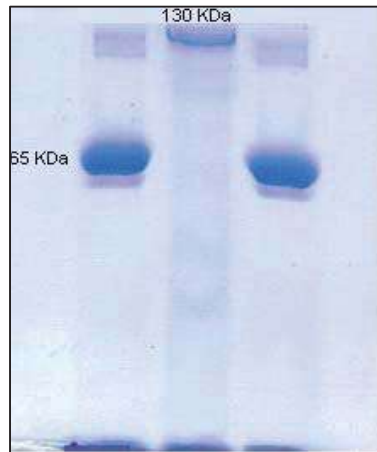


Figura 10.

SDS-PAGE de la toxina Cry 1Ac.

- Una banda de 130 KDa que representa a Cry 1Ac con actividad insecticida.
- Dos bandas de 65 KDa representando a la proteína Cry 1Ac con actividad inmunogénica.

DISCUSIÓN

En los últimos años se ha observado un aumento importante de micosis oportunistas en nuestro país, en parte a la expansión de la población de pacientes inmunosuprimidos e individuos atópicos. Además de las infecciones fúngicas oportunistas clásicas, como Candidiasis, Criptococosis, Aspergilosis Mucormicosis, actualmente han emergido micosis por otros hongos que hasta hace poco tiempo se consideraban Simples contaminantes ambientales, como por ejemplo *Fusarium*, *Absidia*, *Malassezia*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Hormodendrum*, *Helmintosporium*, etc.⁴⁷

La existencia de individuos con RA sensibilizados con antígenos fúngicos es un hecho constatado en diversos trabajos publicados⁴⁸, durante muchos años las esporas fúngicas se han reconocido como una causa potencial de alergia respiratoria.⁴⁹ Los aislados fúngicos utilizados en la realización de este trabajo, coinciden con los referidos en la literatura mundial como a alergia respiratoria (rinitis alérgica). Los aislados utilizados en este trabajo fueron *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Fusarium* y *Absidia*. Se ha considerado que ***Alternaria*** posee epítopes clasificados como Alt. a1 hasta Alt. a22 y que inducen reacciones de hipersensibilidad en concentraciones muy bajas, Alt a 1 es el alergeno principal que es reconocido por los anticuerpos IgE, y tiene un peso molecular de 30 KDa.⁵⁰ de ***Cladosporium*** se conocen 60 extractos antigénicos, los más importantes son: Cla h1 (antígeno 32), Cla h2 (una enolasa o antígeno 54), Cla h3 (aldehído deshidrogenasa), Cla h4, Cla h5, Cla h6 (una enolasa) y Cla H12.⁵¹ ***Fusarium*** presenta micotoxinas como fumonicina, zearalenona (toxinaF2), desoxinivalenol (vomitoxina), nivalenol, y toxinas HT2 y T2.⁵² ***Penicillium*** es productor de penicilina y alcaloides como Roquefortina C, Meleagrina y Chrisogina.⁵³

Aspergillus posee los epítopes que van de Asp f 1 a Asp f 22.⁵⁴ Estos desencadenan síntomas clínicos de Rinitis alérgica en asociación con asma; que se correlacionan con la densidad de esporas presentes en el medio ambiente en el cual se desenvuelve el paciente, lo cual concuerda con los datos referidos en la literatura mundial.⁵⁵

La predisposición genética de las alergias es un tema hace años reconocido, algunos elementos que apoyan este criterio son: la alta frecuencia de familiares alérgicos entre individuos que sufren estas enfermedades, la existencia de polimorfismos en receptores para β -adrenérgicos, esteroides y moléculas de IgE que facilitan la expresión de la reacción alérgica, estos factores entre otros explican el importante papel de la genética en la evolución y tratamiento de la enfermedad alérgica.⁵⁶ los principales factores de riesgo son antecedentes personales de atopia además de concentraciones séricas de IgE aumentadas y la exposición intensa a aeroalergenos.⁵⁷ La sensibilidad a los hongos puede desencadenarse como resultado de la inhalación sistémica de esporas.¹² Esto ha obligado a los microbiólogos a familiarizarse con la morfología macro y microscópica de estos agentes, ya que el diagnóstico micológico es eminentemente morfológico, especialmente en hongos filamentosos. Los parámetros citados por diversos autores constan en identificar tanto las colonias como las estructuras fúngicas.²⁵ En este trabajo se logró obtener preparados de calidad donde las estructuras fúngicas se conservaron de manera adecuada. Los biotipificados por equipo **Biolog** correspondieron a cepas de hongos alérgicos, que han sido ampliamente citados en estudios anteriores.⁵⁸

Por otro lado, los problemas de seguridad y toxicidad de los fármacos antifúngicos (principalmente de los polienos Anfotericina B y Nistatina), o de aparición de resistencias microbiológicas (sobre todo a Fluconazol) hacen imprescindible el desarrollo de nuevos antifúngicos que aporten unas ventajas apreciables respecto a los existentes.

Haciendo un análisis comparativo con antifúngicos poliénicos tal como la Anfotericina B o la nistatina. Ambos fungicidas se unen preferentemente al ergosterol que es el esteroide más abundante en la membrana plasmática de los hongos y en menor grado el colesterol, induciendo cambios de permeabilidad de la membrana, con la salida del contenido celular a través de la membrana fúngica.^{62,}

⁶³ El mecanismo de Cry 1Ac sobre el crecimiento en hongos alérgicos aún no está definido, pero podría ser que actúe de la misma manera que los antifúngicos poliénicos e inducir la salida de iones. Este efecto resultó ser selectivo para algunos géneros de hongos. Se cree que Cry 1Ac tiene especificidad por la membrana fúngica, puesto que se podría unir a carbohidratos de superficie específicos de cada hongo.

Por otro lado Cry 1Ac induce a la explosión oxidativa en monocitos y neutrofilos humanos, este efecto es mayor en monocitos, los efectos más significativos ocurren cuando Cry 1Ac es usada a concentraciones bajas 3.9 $\mu\text{g/mL}$ y 7.8 $\mu\text{g/mL}$.³⁹ el efecto de inhibición que presenta Cry 1Ac en hongos alergénicos fue a concentraciones bajas, similares a las utilizadas con monocitos y neutrófilos humanos. En estudios anteriores se ha demostrado que Cry 1Ac tiene funciones inmunogénicas y como adyuvante en mamíferos.⁴² el efecto es selectivo y pudiera relacionarse con la composición celular de cada hongo. Cry 1Ac pueda presentar dos efectos, el primero es que puede detener el crecimiento y este se reanuda en el momento que se retira el agente y por tal, ejercer un efecto fungistático; y el segundo es que la inhibición sea irreversible; esto es que las células fúngicas no podrán reproducirse y por deducción Cry 1Ac poseer actividad fungicida. Se encontró una inhibición del crecimiento de:

Alternaria sp, *Absidia sp* y *Eupenicillium sp*. Con resultados *in Vitro* encontrados en este trabajo se cubren los objetivos general y específicos de este trabajo y a futuro, recomendamos se dirija la atención a dilucidar los mecanismos moleculares que explican su acción sobre hongos alergénicos como base para el diseño de nuevos fármacos como inmunomoduladores, vacunas y fungicidas.

CONCLUSIONES

- 1.- Los sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas activadas por Cry 1Ac, no presentan propiedades antifúngicas.
- 2.- La toxina Cry 1Ac a concentraciones bajas inhibió el crecimiento fúngico en *Absidia sp.* *Alternaria sp.* y *Eupenicillium sp.*
- 3.- Cry 1Ac podría ser una alternativa para el tratamiento de rinitis alérgica inducida por *Absidia sp.* *Eupenicillium sp.* y *Alternaria sp.*
- 4.- Este efecto selectivo de Cry 1Ac sobre hongos alergénicos pudiera usarse en el manejo de enfermedades alérgicas, la obtención de fungicidas y en la inmunomodulación de respuestas de mucosas a hongos alergénicos.

ANEXO 1

Tabla 8. Reactivos material y equipo

REACTIVOS	MATERIAL	EQUIPO
Azul de tripano	Matraz volumétrico 1000 ml.	Incubadora de atmósfera de CO ₂ .
Azul de lactofenol	Matraz volumétrico de 500 ml.	Ultra centrifuga refrigerada.
Ficoll-Hypaque	Pipetas volumétricas de 1, 5 y 10mL	Campana de bioseguridad (flujo laminar).
Agua bi-destilada	Pipetas Pasteur.	Mechero de bunsen.
Etanol 70%, etanol abs	Cajas de petri.	Micropipetas.
Cloro 6%	Tubos Ependorf	Potenciómetro.
	Pinzas de disección.	Microscopio
	Tubos de ensaye.	Balanzas granataria y analitica
	Membranas de papel celofán.	Agitador
	Parafilm.	Autoclave
	Discos de papel filtro	
	Papel aluminio.	
	Vaso de precipitados de 100 ml,500 ml.	
	y 1000 ml	
	Placas de 96 posillos.	
	Tubos cónicos de 50 ml.	
	Frasco para cultivo celular.	
	Puntas azules, amarillas y blancas para micropipeta.	
	Jeringas desechables de 3 y 5 ml.	
	Filtros milipore	
	Propipetas	
	Guantes.	
	Cubre bocas.	
	Algodón.	
	Marcador.	
	Tijeras.	

ANEXO 2

Material biológico.

Toxina Cry 1Ac. de *Bacillus thuringiensis*

Cepas de hongos alergénicos.

Sangre periférica.

Suero fetal bovino.

Heparina (anticoagulante).

Ficoll hypaque.

Fitohemaglutinina.

Amikacina.

Medios de cultivo utilizados

MEDIO PDA (Agar de dextrosa y papa)

Modo de Preparación.

Disolver 39gr del medio en 1000 ml de agua destilada y agitar constantemente, calentar a ebullición hasta alcanzar la total disolución, esterilizar durante 15 min. Y 121°C, atemperar y vaciar en caja petri.

RPMI 1640 médium – Dry Powder Media

Descripción:

- Formulación estándar con D-glucosa y bicarbonato de sodio, puede complementarse individualmente con L-glutamina

RPMI 1640 es un medio de cultivo celular básico usado para una gama amplia de aplicaciones. Para perfeccionar el cultivo celular de ciertos tipos de células puede complementarse con el suero, vitaminas y aminoácidos.

Modo de Preparación.

- Mida 5% menos de agua destilada del volumen total deseado de medio, usando un recipiente que pueda contener el volumen deseado.

- Agregar el medio en polvo en agua a una temperatura de 15 – 30 °C (cuarto de temperatura) revolviendo con cuidado. (No usar agua caliente).
- Enjuague dentro y fuera del paquete para remover todo los rastros de polvo que haya.
- Agregar 2.0 g. de NaHCO_3 por cada litro de medio.
- Diluir al volumen deseado con agua destilada hasta disolver.
- Ajustar el pH* del medio a 0.2-0.3 debajo del deseado para trabajar. Se recomienda usar 1N NaOH o 1N HCl (agregar lentamente). Después de ajustar el pH, guardar el medio en un contenedor, hasta que este sea filtrado.
- Esterilizar inmediatamente por filtración de membrana.
- Esterilizar por filtración con un filtro milipore de 0.22 μl

* Unidades de pH generalmente suben a 0.1 - 0.3 en filtración.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.- Pedraza Escalona MM, Rodríguez Romero A. Bases inmunológicas y moleculares de la alergenidad. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas* 2004; 13: 5-10.
2. Carrada Bravo T. Asma: prevalencia, patogenia y perspectivas de los nuevos tratamientos. *Revista Alergia México* 2002; 49: 87-94.
- 3.-Rodríguez Mosquera M. Rinitis Alérgica. *Ter Sist Nac Salud* 2000; 24: 1-8.
- 4.- Martínez RV, Castañeda C, Esquivel G, Lazo SJ, Velasco V. "Fungoesporas en el hábitat del paciente asmático en una zona semidesértica en México". *Revista Alergia México* 2002; 49: 2-7
- 5.- Chapman JA, Terll AL, Jacobs RL, Charlesworth EN, Bardana EJ. "Toxic mold: phantom risk vs science". *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 91: 222-232.
- 6.- Meza M, Espinosa S, Orozco S, Rosales M, Huerta J. "Cambios en la sensibilidad de alergenios intradomiciliarios y extradomiciliarios en la ciudad de México: Estudio de 2000 niños a lo largo de diez años". *Alergia e Inmunología Pediátrica* 1999; 8: 160-164.
- 7.-García Caballero R. Nader Octavio. Correlación entre pruebas cutáneas positivas a hongos, IgE total, e IgE específica por ELISA y cultivos de hongos en el medio ambiente del paciente pediátrico alérgico. *Rev Alergia México* 2001; 5: 137-40.
- 8.- Buzina W, Braun H, Freudenschuss K, et al. "The basidiomycete *Schizophyllum commune* in paranasal sinuses". *Rev Med Micol* 2003; 46: 23-27.
- 9.- Espinosa Morales SM. Hipersensibilidad a aeroalergenios y su relación con el lugar de residencia. *Revista Alergia México* 1993; 40: 13-15.
- 10.- Carrillo Muñoz AJ, Brio S. Una nueva generación de fármacos Antifúngicos *Rev. Iberoam Micol* 2001; 18:2-5.
- 11.-Comunicación personal del Rodríguez Orozco.
- 12.- http://www.pediatraldia.cl/alergenios_ambientales.htm
- 13.- <http://www.redalergia.com.ar/publico/contenidos/rinitis/fiebre.htm>
- 14.- <http://www.homeopatiaflores.com/alergias.html>

- 16.- Cisneros Pérez V, Álvaro Esquivel C. Prevalencia de rinitis Alérgica en la ciudad de Durango, México. Revista Alergia México 2004; 51: 49-53.
- 17.- Gonzalez Diaz S., Arias Cruz A. Rinitis alérgica y asma: dos padecimientos ¿una misma enfermedad? Revista Alergia México 2002; 49:20-24
- 18.- <http://www.copeson.org.mx/informacion/rinalerg.htm>
- 19.- <http://www.higiene.edu.uy/cefa/uti4/ht1.htm>
- 20.-(www.redalergia.com.ar/.../alergia/mecanismo.htm)
- 21.- <http://med.unne.edu.ar/catedras/fisiologia1/ige.htm>
- 22.- El reino de los hongos
- 23.- **Biología y clasificación de los hongos**
- 24.- Microbiología Zinsser 20ª edición Ed. Medica panamericana Capitulo VI p. 1427-1440.
- 25.- Koneman Elmer W., Allen S.D., Janda M.W., Schreckenber P.C.,Winn Washington C. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana, Quinta edición; 1999: p.
- 26.- Lizaso,M.T, Garcia B.E, Gomez B, Zabalegui A, Rodríguez M.J, Tabar A.I Tratamiento de la alergia a Hongos. ANALES 2003; 26: 1-5
- 27.- Epitopes
- 28.- Ruiz Reyes H. Alergia a Hongos. División de estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- 29.- Goodman y Gilman, (1997). Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. Novena edición Ed. Mc Graw-Hill interamericana p. 1247-1262
- 30.- (artículo de antimicóticos)
- 31.- Vanden Bossche y col., 1995
- 32.- Peman 1998
- 33.- Soberón M, Bravo A, Bacillus thuringiensis y sus toxinas insecticidas. Instituto de Biotecnología/ Universidad Nacional Autonoma de Mexico. Ap.postal 510-3. Cuernavaca 62250, Morelos. México.
<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap12/capitulo.html>
- 34.-<http://images.google.com.mx/imgres?imgurl>
- 35.- <http://www.ippc.orst.edu/dir/microbial/bt/crystal.gif&imgrefurl>
- 36.-<http://www.ippc.orst.edu/dir/microbial/bt/&h=208&w=268&sz=29&tbnid=fk4Ds37>
- 37.- Fernández O, Vega L. Tecnologías de producción de Bacillus thuringiensis. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal Playa, Habana Cuba.
- 38.-Soberon M, Rausell C, Pardo L. Aventuras de la toxina Cry 1Ac de *Bacillus thuringiensis* en la membrana de la célula blanco del insecto. XXV

CONGRESO NACIONAL DE BIOQUIMICA del 28 de noviembre al 3 de diciembre del 2004. Resumen de simposium simultáneos.

39.- Vásquez Padrón RI. Identificación del efecto bioquímico e inmunológico de la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* en mamíferos.

XXV CONGRESO NACIONAL DE BIOQUIMICA del 28 de noviembre al 3 de diciembre del 2004. Resumen de simposium simultáneos.

41.- ASPECTOS RELACIONADOS CON LA PRODUCCION DE Bth)

42.-Rodríguez Orozco AR.Rico Rosillo G. y López Revilla R. The Efecct of Cry 1Ac on Human Monocytes and Neutrophil Activation. Allergy Clin Immunol Int-J World Allergy Org 2005; 17:64-65.

43. - Rodríguez Orozco AR. El reto de obtener respuestas inmunogénicas en mucosas. Uso de coadyuvantes. México, D.F. 2003:161165

44.- Mazuelos Martín E, Lacasa Cantón E, Ingroff – Espinel A. Otros métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. Rev Iberoam de Micol; 2001: 16-1, 16-9.

45.- Lacasa Cantón E, Mazuelos Martín E, Ingroff – Espinel A. Pruebas estandarizadas para la sensibilidad a los antifúngicos. Rev Iberoam de Micol; 2001: 15-1, 15-13.

46. - Manual de microbiología de farma

47. -Acotar

48. - (Bartra JT, 2003), tesis de iliana buscar bibliografía.

49. -(Acotar)

50. - Bial-Arístegui 19. *Alternaria alternata* (Fries) Keisser

51. - Bial-Arístegui 27. *Cladosporium herbarum* (Person) Link: Fries

52. - Bial-Arístegui 31. *Fusarium culmorum* (W.G.Smith) Saccardo

53.- Bial-Arístegui 37. *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling

54. -Bial-Arístegui 22. *Aspergillus fumigatus* (Fresenius)

Rev. Iberoam Micol 2002

55.- (García Caballero R y cols., 2001)

56.- Schoenwetter WF., 2000 Tesis de iliana

57.- Consenso Multitudinario en Rinitis Alérgica, “Guía diagnóstico-terapéutica de la rinitis alérgica”. 2000

58.-tesis elvia e iliana

59.- Respuesta inmunológica contra hematíes

60.- Actividad antitumoral en el sarcoma asitico de Yoshida

61.-<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap12/capitulo.html>

62.-Educación Médica continuada sección esponsarisada por Galderman S.A
Nuevos antimicóticos y su uso en dermatología

63.- Malgor-Valsecia. Agentes antimicóticos sistemicos.Seccion V capitulo 34