

Lactoferrina en 11 pacientes diagnosticados con esporotricosis cutánea

Alejandro Palma-Ramos¹
Laura E Castrillón-Rivera¹
Silvia Elena Fernández-López¹
Araceli Paredes-Rojas¹
Jorge Ismael Castañeda-Sánchez¹
María del Carmen Padilla-Desgarennes²
María Elisa Vega-Memije³
Roberto Arenas-Guzmán⁴

¹ Laboratorio de Inmunopotenciadores, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

² Laboratorio de Micología, Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua, Secretaría de Salud, México, DF.

³ Servicio de Dermatología.

⁴ Servicio de Micología.

Hospital General Dr. Manuel Gea González, Secretaría de Salud, México, DF.

RESUMEN

Antecedentes: la esporotricosis es una infección fúngica crónica causada por el complejo *Sporothrix schenckii*, se distingue por granulomas epitelioides, tuberculoideos o de cuerpo extraño, formados por histiocitos que rodean un área central de neutrófilos que contribuyen en el sistema de inmunidad inespecífica. En los polimorfonucleares neutrófilos se encuentra la lactoferrina que ejerce una acción protectora contra hongos y levaduras; el efecto antifúngico se atribuye a su capacidad de secuestrar un átomo de Fe^{+2} o Fe^{+3} , y también puede unirse a iones Cu^{+2} , Zn^{+2} y Mn^{+} . Existe evidencia de que la lactoferrina aumenta la actividad fagocítica de los neutrófilos sanguíneos, la actividad de las células NK, el número de células progenitoras de neutrófilos en la sangre y la producción de interferón gamma, es capaz de mostrar actividad antimicrobiana en un amplio espectro de agentes patógenos, entre los que se incluyen bacterias, levaduras, hongos, protozoarios y virus.

Objetivo: demostrar la existencia de lactoferrina sobre las levaduras de *Sporothrix* sp, presentes en los cortes histológicos de pacientes con esporotricosis cutánea.

Material y método: estudio retrospectivo en el que se usaron 11 biopsias de pacientes con diagnóstico de esporotricosis cutánea, atendidos en el Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua y el Hospital General Dr. Manuel Gea González. Se realizaron dos cortes por biopsia, uno para la realización de la técnica de PAS y el otro para el marcaje de lactoferrina. Se utilizó el paquete comercial Cell and Tissue Staining Kit, Goat Kit HRP-AEC System (catálogo número CTS009) R&D Systems, y el anticuerpo primario fue el IgG policlonal anti-lactoferrina humana hecho en cabra por los laboratorios Santa Cruz Biotechnology.

Resultados: encontramos lactoferrina adherida a las levaduras de *Sporothrix* sp, previamente observadas por la reacción de PAS en los cortes estudiados de los 11 pacientes diagnosticados con esporotricosis.

Conclusión: la lactoferrina presente en los gránulos específicos de los neutrófilos polimorfonucleares la encontramos adherida a las levaduras del complejo *Sporothrix schenckii*, ejerciendo la función de secuestro de iones Fe^{+2} y Fe^{+3} , tratando de evitar el desarrollo y la proliferación de este hongo en la esporotricosis cutánea.

Palabras clave: *Sporothrix schenckii*, esporotricosis cutánea, lactoferrina.

Recibido: 15 de enero 2015

Aceptado: 29 de abril 2015

Correspondencia: Alejandro Palma Ramos
Departamento de Sistemas Biológicos
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
Calzada del Hueso 1100
04960 México, DF
alpalma@correo.xoc.uam.mx

Este artículo debe citarse como

Palma-Ramos A, Castrillón-Rivera LE, Fernández-López SE, Paredes-Rojas A y col. Lactoferrina en 11 pacientes diagnosticados con esporotricosis cutánea. Dermatol Rev Mex 2015;59:280-287.

Lactoferrin in 11 patients diagnosed with cutaneous sporotrichosis

ABSTRACT

Background: Sporotrichosis is a chronic fungal infection caused by the *Sporothrix schenckii* complex, is characterized by the presence of granulomas of epithelioid, tuberculoid or foreign body composed of histiocytes surrounding a central area of neutrophils that contribute to the non-specific immune system. Neutrophils are in lactoferrin which exerts a protective action against fungi and yeasts, attributing the antifungal effect to its ability to sequester an atom of Fe^{+2} or Fe^{+3} , and they can also join to Cu^{+2} , Zn^{+2} and Mn^{+} ions. There is evidence that lactoferrin activity increases blood neutrophil phagocytic activity of NK cells, the number of cells progenitors of neutrophils in the blood and the production of gamma interferon; it is able to display antimicrobial activity on a broad spectrum of pathogens among including: bacteria, yeasts, fungi, protozoa and viruses.

Objective: To demonstrate the presence of lactoferrin in *Sporothrix sp* yeasts present on the histological sections of patients with cutaneous sporotrichosis.

Material and method: A retrospective study in which 11 biopsies of patients with diagnosis of cutaneous sporotrichosis attended at Dermatological Center Ladislao de la Pascua and General Hospital Dr. Manuel Gea González, both in Mexico City, were included. Two cuts were made by biopsy, one for the realization of the technique of PAS and the other for the marking of the lactoferrin. We used the commercial kit Cell and Tissue Staining Kit, Goat Kit HRP-AEC System (catalog no. CTS009) R&D Systems, and the primary antibody that was used was the IgG polyclonal anti-human lactoferrin made in goat by Santa Cruz Biotechnology laboratories.

Results: We found the presence of lactoferrin on yeasts of *Sporothrix sp*, previously observed by the reaction of PAS in the studied sections of the 11 patients, already diagnosed with sporotrichosis.

Conclusion: It was found lactoferrin present in the specific granules of polymorphonuclear neutrophils attached to the yeasts of the *Sporothrix schenckii* complex, engaged in kidnapping of ions Fe^{+2} and Fe^{+3} function, trying to prevent the development and proliferation of this fungus in the cutaneous sporotrichosis.

Key words: *Sporothrix schenckii*, cutaneous sporotrichosis, lactoferrin.

ANTECEDENTES

La esporotricosis es una infección fúngica crónica causada por el complejo *Sporothrix schenckii*¹ (Figuras 1 y 2), que generalmente penetra por la

piel a causa de un traumatismo ocasionado con material orgánico contaminado, también se han reportado casos de esporotricosis ocasionados por mordedura de animales (gatos y roedores) y por picadura de insectos; se distingue por

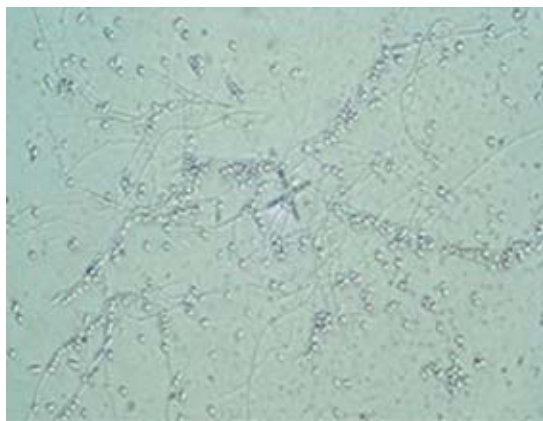


Figura 1. Morfología microscópica de *Sporothrix schenckii*.

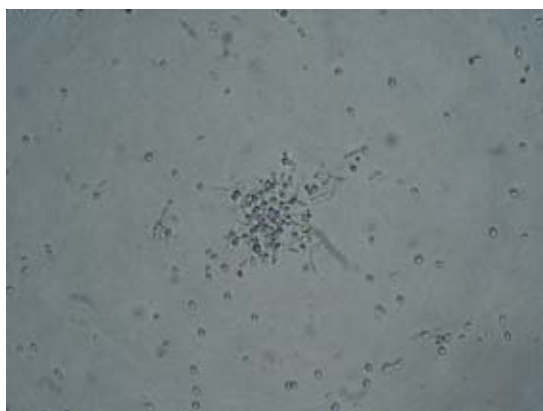


Figura 2. Levaduras de *Sporothrix schenckii*

nódulos cutáneos o subcutáneos ulcerados, eritematosos, verrugosos o ambos, con frecuencia asociados con afectación linfática nodular. En ocasiones puede penetrar por vía inhalatoria causando neumonitis granulomatosa.²

La esporotricosis cutánea se distingue por granulomas epitelioides, tuberculoides o de cuerpo extraño. El característico de la esporotricosis está formado por una masa de histiocitos que rodean

un área central de neutrófilos o material necrótico rodeado de neutrófilos, células plasmáticas y linfocitos con una levadura. El granuloma tuberculoides tiene un área central y está rodeado de fibroblastos, células epitelioides, linfocitos y células gigantes de Langerhans.

La visualización del hongo en el tejido es muy difícil porque se encuentra en poca cantidad y se requiere el examen de múltiples cortes, excepto en muestras de pacientes inmunodeprimidos o con esporotricosis diseminada, en los que el número de organismos suele ser más abundante.³

El cuerpo asteroide esporotricósico se ha estudiado y definido como una estructura levaduriforme rodeada de un halo eosinofílico radiado PAS-positivo, provocado por el proceso conocido como fenómeno de Splendore-Hoeppli. Este halo probablemente es producto de la desintegración de las células huésped y se considera una reacción antígeno-anticuerpo (Figura 3). Puede ocurrir en otras micosis, por lo que se considera patognomónico de esporotricosis, en la que se encuentra en 40 a 50% de los casos.⁴

En estas infecciones es importante conocer cómo la inflamación juega tres papeles esenciales, el primero consiste en entregar moléculas efectoras y células al sitio de infección, y así aumentar la

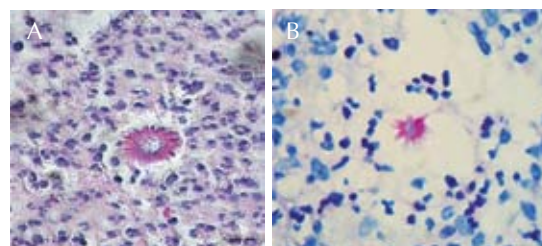


Figura 3. Cuerpos asteroides en esporotricosis. **A.** Cuerpo asteroide de *Sporothrix schenckii* por la técnica de H-E. **B.** Cuerpo asteroide de *Sporothrix schenckii* por la técnica de Ziehl-Neelsen.

muerte de los microorganismos invasores por macrófagos, el segundo es proporcionar una barrera física en la forma de microcoagulación vascular para prevenir la diseminación de la infección en el sistema sanguíneo y el tercero es remover el tejido dañado. Por sus características de duración y células que participan, la inflamación se clasifica en aguda y crónica. La inflamación aguda es un proceso rápido, relativamente corto y se distingue por la exudación de un fluido y migración de leucocitos, inicialmente neutrófilos, mientras que la inflamación crónica se extiende por un periodo prolongado y se asocia con la infiltración de linfocitos y macrófagos, proliferación de vasos sanguíneos y fibrosis. La inflamación se termina cuando el invasor es eliminado y los mediadores secretados son removidos; sin embargo, muchos factores modifican el curso y apariencia morfológica, así como el patrón de terminación y duración de ésta.^{5,6}

Los leucocitos polimorfonucleares contribuyen en el sistema de inmunidad inespecífica por su movilidad, su capacidad para ingerir partículas (fagocitosis) y destruirlas. Esta última propiedad es dependiente de productos de su metabolismo oxidativo, pero está también medida por proteínas de sus gránulos.⁷ En 1975 Baitron mencionó que en gránulos específicos de polimorfonucleares de conejo se encuentra colagenasa, fosfatasa alcalina, lisozima y lactoferrina, mientras que los gránulos azurófilos contienen mieloperoxidasa, β -glucuronidasa, β -galactosidasa, hidrolasas ácidas, proteínas catiónicas y lisozima.⁸⁻¹⁰

La lactoferrina es una glicoproteína monomérica no hémica que se une con el hierro, es sintetizada por neutrófilos y células acinares epiteliales.¹¹ Esta proteína se ha detectado en muchas de las secreciones provenientes de las superficies de las mucosas humanas.¹² En estudios *in vitro* se ha observado que la lactoferrina es capaz de mostrar actividad antimicrobiana en un amplio

espectro de agentes patógenos, entre los que se incluyen bacterias, levaduras, hongos protozoarios y virus.¹³

El efecto bacteriostático relativo a la inhibición de la multiplicación bacteriana está relacionado con su capacidad de capturar Fe^{3+} (ion férrico), que es esencial para el crecimiento y expresión de virulencia de algunos agentes patógenos. El efecto bactericida radica en la capacidad de la lactoferrina de interactuar con cationes divalentes como Ca^{2+} , que contribuyen a estabilizar la superficie bacteriana y componentes bacterianos con carga negativa, como el lipopolisacárido. Esta interacción desorganiza y desestabiliza la superficie celular causando la pérdida de la permeabilidad y finalmente la muerte celular.¹²⁻¹⁴

A nivel sistémico y local, la lactoferrina modula *in vivo* la función de componentes humorales y celulares de la respuesta innata –como neutrófilos, células asesinas naturales, linfocitos T, interferón y interleucina 18– y adaptativa a través de anticuerpos, linfocitos Th1/Th 2 y B. La acción reguladora de la lactoferrina ha despertado creciente interés en el área clínica por sus potenciales aplicaciones profilácticas y terapéuticas para el control de infecciones.¹²

El objetivo de este artículo es demostrar la existencia de lactoferrina en las levaduras de *Sporothrix* sp, presentes en los cortes histológicos de pacientes con esporotricosis cutánea.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo en el que se usaron 11 biopsias de pacientes con diagnóstico de esporotricosis cutánea, atendidos en el Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua y el Hospital General Dr. Manuel Gea González. Se realizaron dos cortes por biopsia, uno para la realización de la técnica de PAS y el otro para el marcaje de lactoferrina.

Técnica de ácido peryódico-Schiff (PAS)¹⁵

Se desparafina y trata con ácido peryódico a 0.6% durante 10 minutos; se lava, seca, agrega reactivo de Schiff por 15 minutos en la oscuridad; después se lava con agua sulfurosa y con agua destilada. Se colorea con hematoxilina de Harris uno o dos minutos y luego se lava, se adiciona amarillo de metilo durante tres minutos y se lava con agua acidulada y destilada. Se deshidrata y monta.

Las estructuras y compuestos PAS positivos (polisacáridos) se observan de color rosa, los núcleos azules y el citoplasma amarillo.

Marcaje por inmunohistoquímica para lactoferrina

Para el marcaje de la enzima lactoferrina se utilizó el paquete comercial Cell and Tissue Staining Kit, Goat Kit HRP-AEC System (catálogo número CTS009) R&D Systems. El anticuerpo primario fue el IgG policlonal anti-lactoferrina humana, hecho en cabra con una concentración de 200 µg/mL por los laboratorios Santa Cruz Biotechnology.

RESULTADOS

Las microfotografías se obtuvieron de biopsias de 11 pacientes con esporotricosis cutánea, a las que se realizaron dos cortes a cada una, uno para la realización de la técnica de PAS, con la que se diagnosticó, y el otro para la realización del marcaje inmunohistológico con IgG anti-lactoferrina humana hecho en cabra, y utilizando el paquete comercial Cell and Tissue Staining Kit, Goat Kit HRP-AEC System (catálogo número CTS009) R&D Systems.

El diagnóstico se efectuó mediante la técnica de PAS para observar las levaduras en los tejidos de los pacientes y tomar como positivas estas

muestras para la búsqueda de la lactoferrina en las mismas (Figura 4).

Técnica de PAS

Al realizar la técnica inmunohistoquímica para demostrar la existencia de lactoferrina en 11 pacientes diagnosticados con esporotricosis cutánea, a los que ya se les habían encontrado levaduras por la técnica de PAS, encontramos lo siguiente: una coloración roja que muestra la existencia de lactoferrina (leucocitaria) porque se usó la técnica de avidina-biotina y peroxidasa. Se usó marcaje con IgG anti-lactoferrina humana hecho en cabra y se utilizó el paquete comercial Cell and Tissue Staining Kit, Goat Kit HRP-AEC System (catálogo número CTS009) R&D Systems (Figura 5).

DISCUSIÓN

En la visualización del hongo en el tejido se observan células levaduriformes con forma de cigarro y con múltiples gemaciones de 3 a 5 mm de diámetro.

Asimismo, en los neutrófilos se encuentra la lactoferrina y en pequeñas cantidades en el plasma sanguíneo (0.2 µg/L); es una glicoproteína de 80 kDa, producida por las células epiteliales de las mucosas de los mamíferos. Pertenece a la familia de las proteínas transportadoras de hierro, denominadas transferrinas.¹⁶⁻¹⁸ Se piensa que la lactoferrina plasmática tiene dos orígenes, el primero es la liberación por parte de los neutrófilos, en respuesta al ataque microbiano.^{19,20} Por otro lado, la lactoferrina que ha cumplido su vida media es transportada a través de la sangre hacia el hígado, donde es reconocida por receptores específicos que la retiran de la circulación.¹⁹⁻²¹ La molécula de lactoferrina está integrada por una cadena polipeptídica simple, plegada en dos lóbulos globulares simétricos (lóbulos N y C) conectados por una región bisagra.^{22,23} Cada

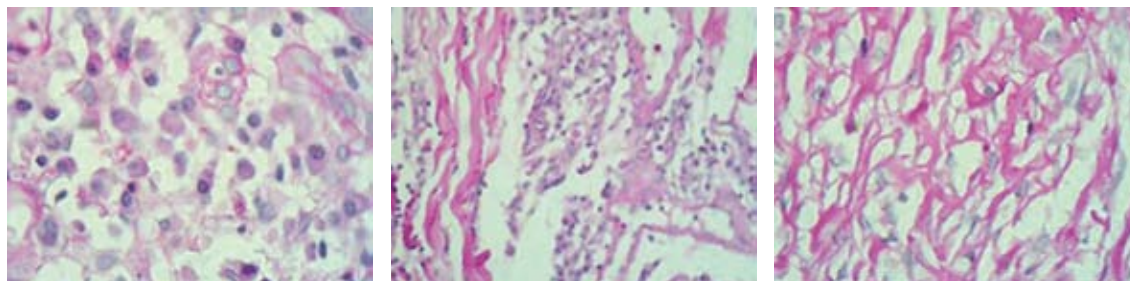


Figura 4. Levaduras de *Sporothrix* sp en tejido de paciente observadas por la técnica de PAS.

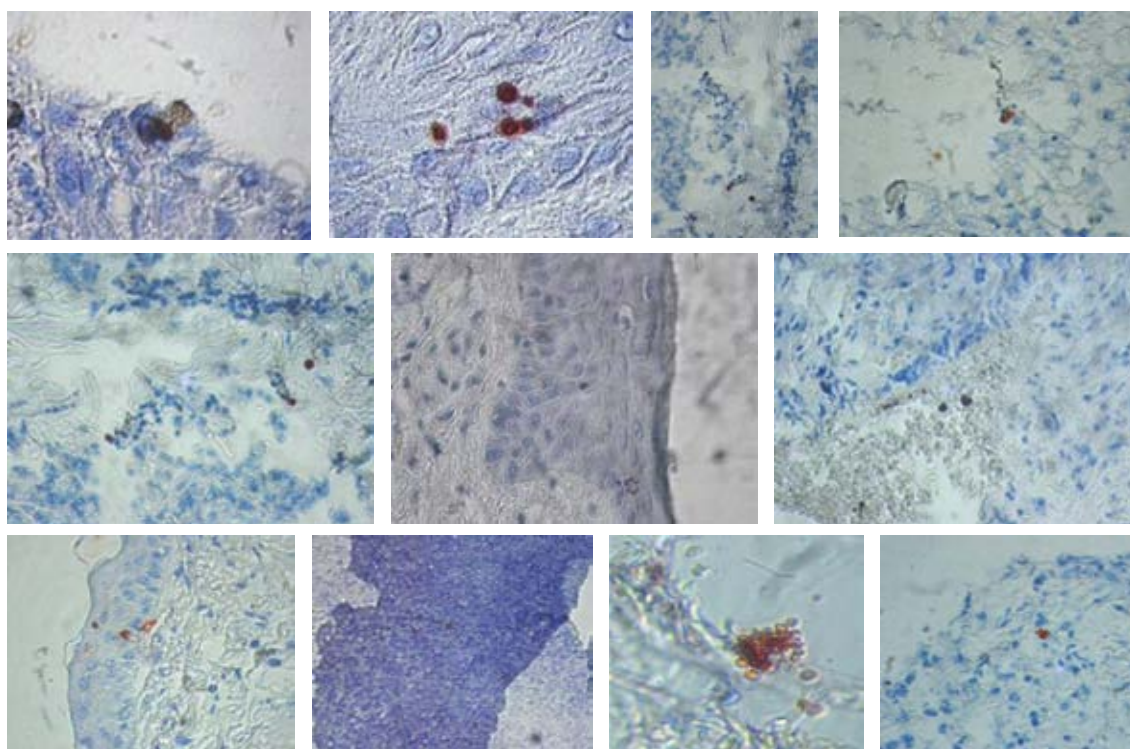


Figura 5. Lactoferrina en cada paciente.

lóbulo es capaz de unir un átomo de Fe^{+2} o Fe^{+3} , aunque también puede unirse a iones Cu^{+2} , Zn^{+2} y Mn^{+2} .^{16,17} Posteriormente se comprobó que la lactoferrina es un componente importante del sistema inmunitario innato, que muestra propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antibacterianas y antivirales, entre otras.^{16,17,23,24}

La lactoferrina también ejerce una acción protectora contra hongos y levaduras. Los primeros estudios al respecto se realizaron con el género *Candida* spp. Kirkpatrick y su grupo,²⁵ junto con otros investigadores, atribuyeron el efecto antifúngico de la lactoferrina a su capacidad de secuestrar Fe .²⁶⁻²⁹ Posteriormente se observó

que la apolactoferrina es capaz de eliminar *C. albicans* y *C. krusei*, alterando la permeabilidad de superficie celular, de manera similar a como ocurre en las bacterias. Existe evidencia de que la lactoferrina aumenta la actividad fagocítica de los neutrófilos sanguíneos, la actividad de las células NK, el número de células progenitoras de neutrófilos en la sangre y la producción de interferón gamma.³⁰⁻³³

La lactoferrina tiene efecto bactericida (frena la proliferación de hongos y virus), bacteriostático y antifúngico (liga iones hierro, privando de un nutriente esencial a las bacterias, inhibiendo su crecimiento), antiviral (se une a la partícula viral impidiendo que se adhiera a la célula hospedera),³⁴ e inmunomoduladora (modula la inflamación por inhibición de la migración de células de Langerhans).³⁵

La importancia de encontrar lactoferrina en las levaduras presentes en la esporotricosis cutánea humana puede ser evitar la proliferación del hongo en levadura o evitar el cambio a su forma filamentosa y su crecimiento.

Asimismo, al observar los cortes de estos 11 pacientes que previamente sabíamos que se encontraban las levaduras, encontramos la lactoferrina unida a las levaduras mediante esta técnica, facilitando así la observación de la levadura en el tejido porque da una coloración roja fácil de localizar en un fondo azul y podría ser una técnica auxiliar en el diagnóstico para manifestar la existencia del agente etiológico de esta y otras micosis porque se encontró en todos los casos estudiados.

CONCLUSIÓN

La lactoferrina presente en los gránulos específicos de los neutrófilos polimorfonucleares la encontramos adherida a las levaduras del complejo *Sporothrix schenckii*, ejerciendo la función

de secuestro de iones Fe^{+2} y Fe^{+3} , tratando de evitar el desarrollo y la proliferación de este hongo en la esporotricosis cutánea.

REFERENCIAS

1. Arenas R. Esporotricosis. Una micosis cosmopolita. *Más Dermatol* 2010;10:22-25.
2. Bada del Moral M, Rangel Gamboa EL, Vergara Takahashi L, Ruiz Juárez I y col. Esporotricosis en Huastusco, Veracruz. *Dermatol Rev Mex* 2011;55:51-54.
3. Rex JH. *Sporothrix schenckii*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, New York, 1995.
4. Padilla Desgarennes MC, Saucedo A. Esporotricosis de doble inoculación. Comunicación de un caso. *Rev Cent Dermatol Pascua* 2001;10:25-30.
5. Kantarci A, Van Dyke TE. Resolution of inflammation in periodontitis. *J Periodontol* 2005;76:2168-2174.
6. Baker J, Mitra RS, Griffiths CE, Dixit VM, Nickoloff BJ. Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet* 1991;337:211-214.
7. Gahr M, Speer CP, Damerau B, Sawatzki G. Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Leukoc Biol* 1991;49:427-433.
8. Bainton DF. Sequential degranulation of the two types of polymorphonuclear leukocyte granules during phagocytosis of microorganisms. *J Cell Biol* 1973;58:249-264.
9. Baitron DF. Neutrophil granules (annotation). *Br J Haematol* 1975;29:17-22.
10. Bullen JJ, Armstrong JA. The role of lactoferrin in the bacterial function of polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 1979;36:781-791.
11. Roland RA, Brewer M, Gauthier JK. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect Immun* 1980;28:893-898.
12. Drago SM, Flores RL, Oliver AG, Jarillo LR y col. La lactoferrina como modulador de la respuesta inmunitaria. *Bioquímica* 2008;33:71-82.
13. Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals* 2004;17:189-196.
14. Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* 1992;56:395-411.
15. Spannhof L. Hidratos de carbono: química práctica. Gustav Fischer Verlag Jena 1964;17-43.
16. Levay PF, Viljoen M. Lactoferrin: a general review. *Acta Haematol* 1995;80:252-267.
17. Lönnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr* 1995;15:93-110.
18. Bezwoda WR, Mansoor N. Lactoferrin from human breast milk and from neutrophil granulocytes. Comparative stu-

- dies of isolation, quantization, characterization and iron binding properties. Biomed Chromatogr 1989;3:121-126.
19. Baynes RD, Bezwoda WR. Lactoferrin and the inflammatory response. Adv Exp Med Biol 1994;357:133-141.
 20. Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, Sengelov H, et al. Human neutrophil granules and secretory vesicles. Eur J Haematol 1993;51:187-198.
 21. Van der Strate BW, Harmen MC, The TH, Sprenger HG, de Vries H, et al. Plasma lactoferrin levels are decreased in end-stage AIDS patients. Viral Immunol 1999;12:197-203.
 22. Anderson BF, Baker HM, Norris GE, Rice DW, Baker EN. Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. J Mol Biol 1989;209:711-734.
 23. Vorland LH. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein. APMIS 1999;107:971-981.
 24. Pakkanen R, Aalto J. Review paper: growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrums. Int Dairy J 1997;7:285-297.
 25. Kirkpatrick CH, Green I, Rich RR, Schade AL. Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron-unsaturated lactoferrin: relation to host-defense mechanisms in chronic mucocutaneous candidiasis. J Infect Dis 1971;124:539-544.
 26. Bullen JJ. The significance of iron in infection. Rev Infect Dis 1981;3:1127-1138.
 27. Bullen JJ, Rogers HJ, Griffiths E. Role of iron in bacterial infection. Curr Top Microbiol Immunol 1978;80:1-35.
 28. Reiter B. The biological significance of lactoferrin. Int J Tissue React 1983;5:87-96.
 29. Reiter B. The biological significance of the non-immunoglobulin protective proteins in milk. Dev Dairy Chem 1985;3:281-336.
 30. Nakajima M, Iwamoto H, Shirasawa T, Miyauchi H, et al. Oral administration of lactoferrin enhances the production of IFN-γ and IL-10 in spleen cells cultured with concanavalin A or lipopolysaccharide. Biomed Res 1999;20:27-33.
 31. Sato R, Inanami O, Tanaka Y, Takase M, Naito Y. Oral administration of bovine lactoferrin for treatment of intractable stomatitis in feline immunodeficiency virus (FIV)-positive and FIV- negative cats. Am J Vet Res 1996;57:1443-1446.
 32. Sekine K, Ushida Y, Kuhara T, Iigo M, et al. Inhibition of initiation and early stage development of aberrant crypt foci and enhanced natural killer activity in male rats administered bovine lactoferrin concomitantly with azoxymethane. Cancer Lett 1997;121:211-216.
 33. Zimecki M, Wlaszczyk A, Cheneau P, Brunel AS, et al. Immunoregulatory effects of a nutritional preparation containing bovine lactoferrin taken orally by healthy individuals. Arch Immun Ther Exp 1998;46:231-240.
 34. Brock JH. The physiology of lactoferrin. Biochem Cell Biol 2002;80:1-6.
 35. Griffiths CE, Cumberbatch M, Tucker SC, Dearman RJ, et al. Exogenous topical lactoferrin inhibits allergen-induced Langerhans cell migration and cutaneous inflammation in humans. Br J Dermatol 2001;1

XXI SEMINARIO INTERNACIONAL CLÍNICO-PATOLÓGICO DE DERMATOPATOLOGÍA

Fecha: Sábado 15 de agosto de 2015
de las 08:00 a las 16:00 horas

Sede: Auditorio Dr. Abraham Ayala González, Hospital General de México

Profesor invitado:

Prof. Dr. Luis Requena Caballero
Servicio de Dermatología, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España

Sociedad médica: Tel. 5578-5222, tel./fax: 5578-0505
Dra. Patricia Mercadillo: tel./fax: 5004-3845

Dirigir correspondencia: Sociedad Médica Dr. Abraham Ayala González,
Hospital General de México
Dr. Balmis 148, col. Doctores, CP 06726, México, DF