

## Expresión de receptores tipo Toll 2 y 4 en macrófagos de piel de pacientes con esporotricosis cutánea

### RESUMEN

**Antecedentes:** la esporotricosis es una infección que afecta la piel y el tejido subcutáneo y linfático, causada por el complejo *Sporothrix schenckii*. En esta micosis interviene la respuesta inmunitaria innata (monocitos-macrófagos y polimorfonucleares), debido a que *Sporothrix* tiene en su pared celular glicoproteínas que pueden ser reconocidas por los receptores tipo Toll 2 y 4, es importante estudiar la participación de estos receptores. Existen escasos estudios, efectuados únicamente en modelos murinos, que evalúan estas moléculas durante la respuesta inmunitaria en la esporotricosis.

**Objetivo:** determinar la expresión de receptores tipo Toll (TLR) 2 y 4 en macrófagos de biopsias de piel de pacientes con esporotricosis cutánea.

**Material y método:** estudio transversal analítico, que incluyó tejido de biopsia de pacientes con esporotricosis y controles. Se usó técnica de inmunohistoquímica, con anticuerpos monoclonales anti TLR2, TLR4 y CD68 (control positivo a macrófagos), revelados mediante el paquete Universal Dako. Las cortes inmunoteñidos se observaron por medio de microscopio óptico para identificar el índice de marcaje por su intensidad y extensión de color en el tejido.

**Resultados:** el índice de marcaje de los receptores TLR2 y TLR4 se observó en la membrana de los queratinocitos, con menor expresión en los pacientes vs los controles con diferencia estadísticamente significativa en TLR4 ( $p=0.002$ ).

**Conclusión:** las moléculas de receptores tipo Toll 2 y 4 se expresaron en la membrana de los queratinocitos y no en macrófagos.

**Palabras clave:** esporotricosis, macrófagos, receptores tipo Toll 2 y 4.

## *Expression of Toll-like receptors 2 and 4 in macrophages of skin of patients with cutaneous sporotrichosis*

### ABSTRACT

**Background:** *Sporotrichosis* is an infection of skin, subcutaneous and lymphatic tissue, caused by *Sporothrix schenckii* complex. In this mycosis, it is involved the innate immune response (monocytes/macrophages and polymorphonuclear), so it is important to study the involvement of

Jorge Mayorga<sup>1</sup>  
Mary Fafutis-Morris<sup>2</sup>  
Alberto Tlacuilo-Parra<sup>3</sup>  
Cecilia Guillén-Vargas<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Jefe del Centro de Referencia en Micología (CE-REMI), Instituto Dermatológico de Jalisco Dr. José Barba Rubio.

<sup>2</sup> Centro de Investigación en Inmunología y Dermatología (CIINDE), Universidad de Guadalajara e Instituto Dermatológico de Jalisco Dr. José Barba Rubio.

<sup>3</sup> Director, Educación e Investigación en Salud, Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional de Occidente, IMSS.

Recibido: 12 de agosto 2014

Aceptado: 27 de noviembre 2014

**Correspondencia:** M en C Jorge Mayorga  
Av. Federalismo Nte. 3102  
45190 Zapopan, Jalisco, México  
jormayo64@yahoo.com.mx

### Este artículo debe citarse como

Mayorga J, Fafutis-Morris M, Tlacuilo-Parra A, Guillén-Vargas C. Expresión de receptores tipo Toll 2 y 4 en macrófagos de piel de pacientes con esporotricosis cutánea. *Dermatol Rev Mex* 2015;59:3-8.

*Toll-like receptors (TLR), as Sporothrix presents in its cell wall glycoproteins that can be recognized by TLR2 and TLR4. There are few studies (and only in murine models) evaluating these molecules during the immune response in sporotrichosis.*

**Objective:** *To determine the expression of TLR2 and TLR4 in macrophages in skin biopsies from patients with cutaneous sporotrichosis.*

**Material and method:** *A cross-sectional, analytical study was done with tissue biopsies from patients with sporotrichosis and controls with immunohistochemistry, using monoclonal antibodies against TLR2, TLR4 and CD68 (positive control macrophages), revealed by Universal Dako kit. The immunostained sections were observed by light microscopy to identify the labeling index by a visual analog scale (color intensity and extension in the tissue).*

**Results:** *The labeling index of receptors TLR4 and TLR2 was observed with lower expression in patients versus controls, with a statistically significant difference in TLR4 ( $p=0.002$ ).*

**Conclusion:** *There was no expression of TLR2 and TLR4 in macrophages of patients with sporotrichosis, these molecules were present in the membrane of keratinocytes.*

**Key words:** *sporotrichosis, macrophages, Toll-like receptors 2 and 4.*

## ANTECEDENTES

La esporotricosis es una micosis causada por especies del complejo *Sporothrix schenckii*, que produce en la piel nódulos que se ulceran (gomas), además, puede afectar el tejido subcutáneo y linfático.<sup>1,2</sup>

Los receptores tipo Toll (TLR) son glicoproteínas integrales de membrana de varias células, que en su dominio extracelular poseen repeticiones ricas en leucina y su dominio intracitoplásmico es homólogo a la interleucina 1.<sup>3</sup> Se expresan en las células del sistema inmunitario: monocitos-macrófagos, dendríticas, neutrófilos, mastocitos, células B, epitelio intestinal, respiratorio y la piel. Inducen la expresión de genes que codifican para péptidos antimicrobianos naturales, molé-

culas coestimuladoras y citocinas importantes para la regulación y activación de la respuesta inmunitaria adaptativa.<sup>4</sup> Pertenecen a la familia de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), involucrados en la detección de patógenos (protozoarios, hongos, bacterias y virus). En el humano existen 13 receptores tipo Toll que se diferencian por su secuencia de aminoácidos.<sup>5</sup>

Las células de la respuesta inmunitaria reconocen un patrón molecular común y constante de la superficie de los microorganismos, denominado patrón molecular asociado con patógenos, a través de los receptores de reconocimiento de patrones.<sup>6</sup>

Los lípidos en la pared de los hongos pueden actuar como ligandos que activan los receptores

Toll que inducen factores de señalización en las células inmunitarias y que desencadenan la inflamación.<sup>7</sup>

Sassá y su grupo realizaron los primeros estudios de esporotricosis y la participación de receptores Toll (TLR) en modelos murinos, cuyo objetivo fue estudiar el papel del TLR4 durante la respuesta del hospedero ante la infección por *S. schenckii* en ratones infectados con este hongo y un grupo control. Se valoró la respuesta inmunitaria durante 10 semanas a través de la medición de mediadores proinflamatorios (factor de necrosis tumoral alfa [TNF- $\alpha$ ], óxido nítrico e interleucina 10 [IL-10]) en macrófagos peritoneales. Se encontraron cantidades reducidas de los mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios en ratones deficientes de TLR4, lo que sugiere la implicación de este receptor en el reconocimiento de este agente infeccioso.<sup>8</sup>

Acorci-Valerio y colaboradores estudiaron la expresión de TLR2 y 4 en neutrófilos humanos activados con el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interleucina 15 (IL-15), e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) inoculados con *Paracoccidioides brasiliensis*. El hongo incrementó la expresión de TLR2 que inducía un efecto adicional a las citocinas. Por el contrario, inhibió la expresión del TLR4. Los resultados sugieren que *P. brasiliensis* utiliza TLR4 para acceder a los neutrófilos humanos. Esta interacción da lugar a la producción de interleucinas 8 y 10, lo que puede considerarse mecanismo patógeno en esta infección micótica.<sup>9</sup>

Awasthi estudió la diseminación fúngica, la mortalidad y la respuesta inmunitaria humoral en ratones con defecto en la expresión de TLR4, infectados con una dosis subletal de *Coccidioides posadasii*. Los ratones con defecto fueron igualmente susceptibles que aquellos con TLR4 intacto. Los resultados sugieren que el TLR4 puede no estar involucrado en la inducción de

la defensa del hospedero contra este hongo, pero ser fundamental para la difusión del mismo.<sup>10</sup>

## MATERIAL Y MÉTODO

Estudio transversal, analítico, efectuado en 10 pacientes con esporotricosis y 10 controles, pareados en género y edad  $\pm$  cinco años.

Los criterios de inclusión fueron: biopsia de pacientes con esporotricosis (cultivo previo positivo), cualquier género y edad. De los sujetos control la piel sana se obtuvo de un procedimiento quirúrgico por lesiones no malignas.

Las biopsias se incluyeron en parafina, se realizaron cortes de 3  $\mu$ m que se colocaron sobre laminillas cargadas (4 cortes/portaobjeto). El tejido se desparafinó en xilol y se rehidrató a través de una serie secuencial de etanol.

En el estudio inmunohistoquímico se utilizaron anticuerpos monoclonales anti TLR2, TLR4 y CD68 (control positivo a macrófagos, control negativo: solución de suero fetal bovino+albúmina), que fueron revelados mediante el paquete Universal Dako. Las secciones inmunoteñidas se analizaron mediante microscopía de luz (40x) para identificar y registrar el índice de marcaje, mediante una escala visual análoga por la intensidad y extensión de color en el tejido, que fue: sin marca (negativo), leve (+), moderado (++) y severo (+++).

Los resultados se analizaron mediante estadística descriptiva y medidas de tendencia central (proporciones y mediana), así como de dispersión (desviación estándar) y  $\chi^2$ . Para determinar la significación estadística de contraste entre las variables se realizó prueba no paramétrica de una y dos colas con la prueba exacta de Fisher. Los datos se procesaron en el paquete estadístico EPI Info 15. Se consideró diferencia significativa al obtener un valor de  $p < 0.050$  con intervalo de confianza de 95%.

**RESULTADOS**

De los 20 individuos estudiados, 14 (70%) eran del género masculino (7 controles y 7 pacientes). Respecto de la edad de los pacientes, el menor fue de 11 años y el mayor de 74, con mediana de 48 ± 22 años; la mediana de edad de los controles fue de 46 ± 21 años.

De los pacientes con esporotricosis, 5 tenían la variedad fija y cinco linfangítica, las topografías afectadas fueron las extremidades superiores en cinco sujetos (50%), las extremidades inferiores en dos (20%) y hubo un caso con afectación en la cara, el cuello y el tronco cada uno (Cuadro 1).

En los resultados de la inmunohistoquímica para el control negativo, los pacientes y los controles no mostraron marcaje en el 100%.

El marcaje del anticuerpo CD68 (control positivo para macrófagos) se observó en 100% de los pacientes vs 90% de los controles. No encontramos diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

La expresión de TLR2 en los tejidos de pacientes se observó con un índice de marcaje de 70% (predominó en seis pacientes la intensidad de 1+) vs 90% de los sujetos control (en 6 sujetos

la intensidad fue de 2+, Cuadro 2); esta marca se observó en ambos grupos en la epidermis, en los queratinocitos (Figura 1), con p=0.055.

El marcaje de TLR4 en la piel de pacientes con esporotricosis se observó en 70% (4 pacientes con 1+) vs 100% de los controles (6 sujetos con índice de 3+, Cuadro 3); esta marca se expresó en la epidermis, principalmente en los queratinocitos (Figura 2), con significación estadística entre ambos grupos de p=0.002 con la prueba exacta de Fisher y de p=0.0043 con la prueba  $\chi^2$ .

**DISCUSIÓN**

Los datos epidemiológicos de los pacientes con esporotricosis en este estudio son similares a los

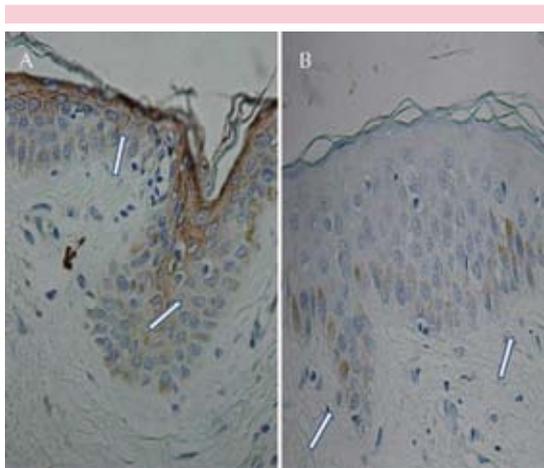
**Cuadro 2.** Índice de marcaje de los receptores tipo Toll 2

Índice de marcaje	Controles (90%)	Pacientes (70%)	Total (%)
Negativo	1	3	4 (20)
+	2	6	8 (40)
++	6	1	7 (35)
+++	1	0	1 (5)
Total	10	10	20 (100)
Prueba exacta de Fisher	Significación exacta (bilateral)		n
	p=0.055		20

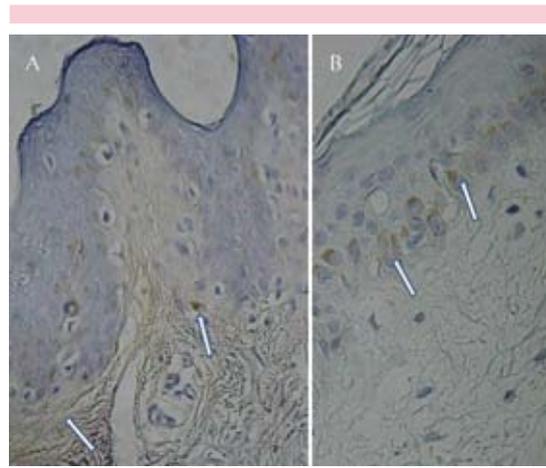
Índice de marcaje: (+) leve; (++) moderado; (+++) severo.

**Cuadro 1.** Datos sociodemográficos de pacientes con esporotricosis y sujetos control

Género, edad en años	Pacientes		Controles	
	Topografía	Variedad clínica	Género, edad en años	Estudio histopatológico
Fem, 59	Cara	Fija	Fem, 59	Quiste epidérmico
Masc, 26	Extremidad superior	Fija	Masc, 26	Nevo epidérmico
Masc, 28	Tronco	Fija	Masc, 28	Quiste epidérmico
Fem, 50	Extremidad superior	Fija	Fem, 50	Quiste triquilemico
Masc, 18	Cuello	Fija	Masc, 23	Quiste epidérmico
Masc, 46	Extremidad inferior	Linfangítica	Masc, 42	Nevo intradérmico
Masc, 11	Extremidad superior	Linfangítica	Masc, 14	Nevo epidérmico
Fem, 67	Extremidad superior	Linfangítica	Fem, 67	Quiste epidérmico
Masc, 74	Extremidad superior	Linfangítica	Masc, 75	Queratosis seborreica
Masc, 66	Extremidad inferior	Linfangítica	Masc, 66	Nevo intradérmico



**Figura 1.** Inmunomarcaje positivo para receptores tipo Toll 2 en queratinocitos de piel. **A.** Sujeto control (+++) principalmente hacia la capa córnea. **B.** Paciente (+) en el estrato basal (40x).



**Figura 2.** Inmunomarcaje positivo para receptores tipo Toll 4 en queratinocitos de piel, principalmente en la capa basal. **A.** Sujeto control (++) **B.** Paciente (+) (40x).

**Cuadro 3.** Índice de marcate de los receptores tipo Toll 4

Índice de marcate	Controles (100%)	Pacientes (70%)	Total (%)
Negativo	0	3	3 (15)
+	0	4	4 (20)
++	4	3	7 (35)
+++	6	0	6 (30)
Total	10	10	20 (100)
Prueba exacta de Fisher	Significación exacta (bilateral)	$\chi^2$	n
	p=0.002	p=0.0043	20

Índice de marcate: (+) leve; (++) moderado; (+++) severo.

reportados por diferentes autores respecto de esta micosis, de manera que predominó el sexo masculino, la edad varió entre 11 y 74 años, la ocupación predominante fue la de campesino y las extremidades superiores fueron la topografía más afectada.<sup>1,2,11,12</sup>

La expresión de CD68 como control positivo para macrófagos se encontró en todos los pacientes vs 90% de los controles; sabemos que

estas células son importantes en la fagocitosis de antígenos.

En este estudio no encontramos expresión de TLR2 y 4 en macrófagos de pacientes con esporotricosis, sólo estuvo presente en queratinocitos, lo que hace suponer que los macrófagos de nuestros pacientes no realizan una respuesta inmunitaria eficiente contra la infección por *S. schenckii*.

Los queratinocitos representan más de 80% de las células epidérmicas, mantienen la estructura de la epidermis mediante la producción de queratina y actúan como barrera física contra una gran variedad de microorganismos exógenos. Además, participan en el inicio de la respuesta inmunitaria epidérmica, expresan receptores tipo Toll, como lo observamos en este trabajo, y son fuente importante de citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos al reconocer el patrón molecular asociado con patógenos mediante estos receptores.<sup>13</sup> Asimismo, Palma y su grupo reportaron la influencia de los queratinocitos a través de TLR2 y la producción de mediadores

inflamatorios para activar neutrófilos contra actinomicetoma,<sup>13</sup> con base en lo anterior, estas células también pueden desempeñar un papel clave en la esporotricosis.

La expresión de TLR4 está disminuida en los pacientes en comparación con el grupo control: 100 vs 70%, respectivamente, con significación estadística de  $p=0.002$ . Al respecto, Sassá y su grupo estudiaron ratones cuyos macrófagos eran deficientes en TLR4 y observaron que estas células, al ser estimuladas con *S. schenckii*, disminuían la liberación de mediadores proinflamatorios; los autores sugieren que esta molécula puede estar implicada en la infección por este hongo.<sup>8</sup>

Al comparar la expresión de marcaje de TLR2 y 4 entre la esporotricosis fija vs linfagítica, observamos que los primeros mostraron menor índice, lo que llama fuertemente la atención, porque la forma fija es menos invasiva y sugiere que debe haber mayor expresión de estas moléculas en estos pacientes que, además, tienen mejor respuesta inmunológica.

Para tener una explicación lógica de estos resultados es necesario profundizar en el estudio de los mediadores pro e inflamatorios provenientes de las células que expresan estos receptores y plantear nuevas estrategias que permitan confirmar la inhibición de estas moléculas por este microorganismo.

## REFERENCIAS

1. Mayorga J, Tarango-Martínez VM, Barba-Rubio J. Esporotricosis 100 años después (1898-1998). *Dermatología Rev Mex* 1999;43:S22-S29.
2. Vásquez-del Mercado E, Arenas R, Padilla-Desgarenes C. Sporotrichosis *Clin Dermatol* 2012;30:437-443.
3. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499-511.
4. Medzhitov R, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-397.
5. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17:1-14.
6. Chávez D. Receptores tipo Toll (Toll like receptors). *Rev Lab* 2007;1:3-9.
7. Lai Y. Toll-like receptors in skin infections and inflammatory diseases. *Infect Disord Drug Targets* 2008;8:144-155.
8. Sassá MF, Satri AE, Sousa LF, Ribeiro LC, et al. Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. *Immunology* 2009;128:301-309.
9. Acorci-Valério MJ, Bordon-Graciani AP, Dias-Melicio LA, de Assis Golim M, et al. Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophils functions against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Scand J Immunol* 2010;71:99-108.
10. Awasthi S. Susceptibility of TLR4-defective C3H/HeJ mice to *Coccidioides posadasii* infection. *Med Mycol* 2010;48:470-475.
11. Davis BA. Sporotrichosis. *Dermatol Clin* 1996;14:69-75.
12. Rubio G, Sánchez G, Porras L, Alvarado Z. Esporotricosis: prevalencia, perfil clínico y epidemiológico en un centro de referencia en Colombia. *Rev Iberoam Micol* 2010;27:75-79.
13. Palma-Ramos A, Castrillón-Rivera LE, Encinas-Parra MG, Padilla-Desgarenes C, Arenas-Guzmán R. Participación de los queratinocitos en la respuesta inmunitaria contra actinomicetoma. *Dermatología Rev Mex* 2009;53:225-233.