

<https://doi.org/10.24245/dermatolrevmex.v69i6.10835>

Determinación de receptores tipo Toll y citocinas proinflamatorias de queratinocitos humanos (HaCaT), estimulados con *Candida albicans* y *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*)

Determination of Toll-like receptors and pro-inflammatory cytokines in human keratinocytes (HaCaT), stimulated with Candida albicans and Candida glabrata (Nakaseomyces glabrata).

Alejandro Palma Ramos, Laura E Castrillón Rivera, Jorge Ismael Castañeda Sánchez, Rodrigo Palma Mejía, Violeta Karen Espinosa Antúnez

Resumen

OBJETIVO: Estudiar la activación de la respuesta inmunitaria innata de queratinocitos HaCaT con *Candida albicans* o *Candida glabrata* (*N. glabrata*) vivas y muertas determinando la expresión relativa (RT-qPCR) de las quimiocinas IL-8, MCP-1, las citocinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α y TGF- β y los receptores tipo Toll 2, 4 y 6.

MATERIALES Y MÉTODOS: Estudio experimental, efectuado de noviembre de 2024 a abril de 2025, en el que se utilizaron cultivos de queratinocitos HaCaT estimulados con cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 o *Candida glabrata* (*N. glabrata*) (aislamiento clínico). Con la técnica de RT-qPCR se evaluó la presencia de quimiocinas (IL-8 y MCP-1), citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α y TGF- β) y receptores celulares tipo Toll 2, 4 y 6.

RESULTADOS: Al estimular los queratinocitos con *C. albicans* viva, la mayor expresión se encontró en la IL-8 y el MCP-1. El TNF- α mostró el valor más alto de las citocinas proinflamatorias. Al estimular con la cepa muerta, la expresión de las citocinas y quimiocinas disminuyó de manera considerable. Al utilizar *C. glabrata* viva, la quimiocina con mayor expresión fue la IL-8. Al estimular con *C. glabrata* muerta, el MCP-1 dio la mayor expresión, las citocinas cayeron a un mínimo y el TLR 6 se mantuvo.

CONCLUSIONES: La estimulación de la respuesta inmunitaria innata de queratinocitos HaCaT por *C. albicans* o por *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*) se favorece ante levaduras vivas. Las citocinas proinflamatorias y quimiocinas secretadas (IL-8 y MCP-1) muestran títulos más altos con *Candida albicans*.

PALABRAS CLAVE: *Candida albicans*; *Candida glabrata*; queratinocitos; citocinas; receptores tipo Toll.

Abstract

OBJECTIVE: To study the activation of the innate immune response of HaCaT keratinocytes with live and dead *Candida albicans* or *Candida glabrata* (*Nakaseomyces*

Laboratorio de Inmunobiología, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México.

ORCID

<https://orcid.org/0000-0001-7318-9869>

Recibido: junio 2025

Aceptado: julio 2025

Correspondencia

Alejandro Palma Ramos
alpalma@correo.xoc.uam.mx

Este artículo debe citarse como:

Palma-Ramos A, Castrillón-Rivera LE, Castañeda-Sánchez JI, Palma-Mejía R, Espinosa-Antúnez VK. Determinación de receptores tipo Toll y citocinas proinflamatorias de queratinocitos humanos (HaCaT), estimulados con *Candida albicans* y *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*). Dermatol Rev Mex 2025; 69 (6): 777-789.

glabrata) determining the relative expression (RT-qPCR) of the chemokines IL-8, MCP-1 and the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and TGF- β , as well as Toll-like receptors 2, 4 and 6.

MATERIALS AND METHODS: Experimental study conducted from November 2024 to April 2025 in which HaCaT keratinocyte cultures were used, stimulated with strains of *Candida albicans* ATCC 10231 or *Candida glabrata* (N. *glabrata*) (clinical isolate), evaluating the presence of chemokines (IL-8 and MCP-1), pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , and TGF- β), and Toll-like receptors (2, 4, and 6) using the RT-qPCR technique.

RESULTS: By stimulating the keratinocytes with live *C. albicans*, the highest expression was found in IL-8 and MCP-1. TNF- α showed the highest value among pro-inflammatory cytokines. When stimulated with the dead strain, the expression of cytokines and chemokines decreased considerably. When using live *C. glabrata*, the chemokine with the highest expression was IL-8. When stimulated with dead *C. glabrata*, MCP-1 showed the highest expression, cytokines dropped to a minimum, and TLR 6 maintained its presence.

CONCLUSIONS: The stimulation of the innate immune response of HaCaT keratinocytes by *C. albicans* or *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*) is favored when live yeasts are presented. Pro-inflammatory cytokines and secreted chemokines (IL-8 and MCP-1) showed higher titers with *Candida albicans*.

KEYWORDS: *Candida albicans*; *Candida glabrata*; Keratinocytes; Cytokines; Toll-like receptors.

ANTECEDENTES

La candidiasis cutánea es una infección causada por hongos del género *Candida*, en donde la mayor información de la patogénesis por *C. albicans* en superficies epiteliales se ha demostrado en la mucosa oral y vaginal, mientras que se sabe poco de la invasión de la piel. La colonización y el crecimiento invasivo de *C. albicans* en las superficies epiteliales no está claro porque la adherencia al epitelio del huésped o, incluso, la invasión inicial, puede ser relevante para el establecimiento o mantenimiento de ambos estados, en donde el daño de la célula huésped es una característica distintiva de la invasión patógena que puede ocurrir en diferentes áreas del cuerpo, incluidas las axilas, la ingle, debajo de los senos y entre los dedos de las manos y los pies.¹

Los síntomas pueden variar según la topografía afectada. Sin embargo, la manifestación clínica más observada son las placas eritematosas, pruriginosas, acompañadas de pápulas “satélite” que se manifiestan principalmente como intertrigos cutáneos. Afecta a pacientes con diversas comorbilidades: diabetes mellitus tipo 2, inmunodeficiencias como VIH-SIDA, diversos cánceres o receptores de trasplante de órganos.

En la actualidad *Candida glabrata* (ahora llamada *Nakaseomyces glabrata*) es el segundo agente causal más común de candidemia en diversas regiones geográficas. A pesar de sus diferencias y divergencias filogenéticas, *Candida glabrata* (N. *glabrata*, en adelante *C. glabrata*) y *Candida albicans* son exitosas como patógenos y comensales de los humanos. Ambas especies pueden causar una amplia variedad de infecciones, que

van desde superficiales hasta sistémicas potencialmente letales.²⁻⁵

La adhesión a células epiteliales se ha estudiado en muchas especies de *Candida*, como en *Candida glabrata* (*N. glabrata*) y *C. albicans*, y en diferentes tipos de células epiteliales, incluidos fibroblastos, células epiteliales bucales y otros. Los queratinocitos son el tipo celular más abundante en la epidermis del ser humano, representan el 95% de los cuerpos celulares de esta capa, acompañados, en menor proporción, por los melanocitos, células de Langerhans y de Merkel. Los queratinocitos juegan un papel importante como barrera con el medio externo y, cuando ocurre una invasión de patógenos o el contacto con alérgenos de la epidermis, muestran su lado inmunológico y producen una plétora de citocinas, proteínas de índole proinflamatoria, como son las interleucinas (IL) 1, 6, 7, 8, 10, 12, 15, 18 y 20. Estas citocinas atraen al lugar a células inmunitarias, como los monocitos y los linfocitos T, que comienzan a actuar o a dividirse con la finalidad de destruir al agente patógeno.⁶⁻⁹

Los queratinocitos expresan siete miembros de los receptores tipo Toll humanos: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR9 para la defensa cutánea del huésped. El heterodímero TLR1-TLR2 se asocia con el triacil-lipopéptido, el TLR2 se une a lipoproteínas bacterianas, ácido lipoteicoico (LTA), lipoarabinomanano (LAM) y el peptidoglicano (PGN) de bacterias grampositivas.^{10,11} El heterodímero TLR6/TLR2 es necesario para el reconocimiento de diacil-lipopéptidos, que son comunes en la pared celular de bacterias grampositivas y en el reconocimiento de PAMPs de hongos patógenos.^{12,13,14}

El TLR3 reconoce ARN de doble cadena viral (dsRNA), mientras que el complejo CD14-TLR4/MD-2 se une al lipopolisacárido (LPS) de bacterias gramnegativas, y a la proteína F viral

(induce la secreción de proteínas de choque térmico)^{15,16} el TLR5 se une a la flagelina bacteriana^{17,18,19} y el TLR9 que se encuentra en el retículo endoplásmico participa en la iniciación de la respuesta inmunitaria, seguida al daño epidérmico o infección.²⁰⁻²³

El objetivo de este estudio fue analizar la activación de la respuesta inmunitaria innata de queratinocitos HaCaT con *Candida albicans* o *Candida glabrata* (*N. glabrata*) vivas y muertas determinando la expresión relativa (RT-qPCR) de las quimiocinas IL-8, MCP-1 y las citocinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α y TGF- β , así como de los receptores tipo Toll (2, 4 y 6).

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio experimental, efectuado de noviembre de 2024 a abril de 2025, en el que se utilizaron cultivos de queratinocitos HaCaT estimulados con cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 o *Candida glabrata* (aislamiento clínico). Con la técnica de RT-qPCR se evaluó la presencia de quimiocinas (IL-8 y MCP-1), citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α y TGF- β y receptores celulares tipo Toll (2, 4 y 6).

Microorganismos

Se trabajaron dos cepas: a) la cepa de referencia de *C. albicans* ATCC 10231, y b) un aislamiento clínico de *C. glabrata*. Se sembraron en caldo dextrosa Sabouraud y se incubaron a 37 °C durante 5 días. Se centrifugaron (5000 rpm durante 20 minutos) y el sedimento se ajustó al tubo 1 del nefelómetro de McFarland (300 x 10⁶ UFC/mL), en PBS, se centrifugó y se resuspendió con el mismo volumen en medio D-MEM, suplementado al 10% de suero fetal bovino más penicilina-estreptomicina marca GIBCO; adicionalmente se utilizaron levaduras de ambas cepas inactivadas por calor a 121 °C y 15 Lb de presión, durante 15 minutos, concentradas y ajustadas como se mencionó.

Línea celular de queratinocitos humanos HaCaT²⁴

La línea celular (queratinocitos HaCaT) se cultivó en botellas de 25 cm² con 45 mL de medio D-MEM (GIBCO advanced D-MEM 1X, con D-glucosa a 4500 mg/mL, NEAA, piruvato de sodio a 110 mg/L sin L-glutamina, Invitrogen), suplementado con 5 mL de suero fetal bovino (10%), más 200 µL de una mezcla de penicilina (+10,000 unidades/mL), estreptomycin (+10,000 µg/mL) (GIBCO). Se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%. Se hizo el recambio de medio cada tercer día hasta obtener, aproximadamente, 400 mil células para cada experimento.

Estimulación de los queratinocitos humanos HaCaT con levaduras de *C. albicans* o *C. glabrata*

Se obtuvieron monocapas de queratinocitos HaCaT con 400 mil células para cada tiempo de estimulación en placas de seis pozos. Se lavaron dos veces con PBS a pH 7.4, y se estimularon con 1 mL de las suspensiones de levaduras con una multiplicidad de infección (MOI) de 1:10 levaduras por cada célula, durante 2 horas, y se tomaron muestras a los tiempos 4, 6, 8 y 10 horas.

Para prevenir el crecimiento extracelular de *C. albicans* o *C. glabrata* las monocapas estimuladas se trataron con 2 µg/mL de anfotericina B durante 2 horas; transcurrido este tiempo, el medio se reemplazó por D-MEM adicionado con 1 µg/mL de anfotericina B que se dejó todo el tiempo de la cinética. En cada tiempo las células se lavaron tres veces con PBS y se aplicó la técnica RT-qPCR. Asimismo, se repitió el experimento con las mismas condiciones descritas, pero con levaduras muertas por calor.

Ensayos de infección celular, aislamiento de mRNA y RT-qPCR²⁵

El ensayo de infección celular se llevó a cabo obteniendo monocapas de células HaCaT con

400 mil células por pozo para cada tiempo de infección correspondientes a 0, 2, 4, 6, 8 y 10 horas. Las células infectadas se utilizaron para la obtención de mRNA y por RT-PCR se obtuvo el cDNA; una vez obtenido el cDNA se usó la técnica de qPCR (AB Applied Biosystems, Step One Plus Time PCR System, Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) por duplicado para cada uno de los receptores tipo Toll, las quimiocinas y las citocinas proinflamatorias. Los resultados de la expresión del mRNA de las citocinas y receptores tipo Toll por la técnica de RT-qPCR de queratinocitos humanos HaCaT infectados con levaduras de *C. albicans* o *C. glabrata*, vivas o muertas, a una MOI 10:1, obtenidos de una cinética de 2, 4, 6, 8 y 10 horas, se muestran en gráficas, en las que los valores representados corresponden al promedio de duplicados y se presentan en unidades de expresión relativa.

Aislamiento de mRNA y RT-qPCR para los fragmentos de los genes de citocinas proinflamatorias²⁶

Se obtuvieron monocapas con 400 mil células, y se estimularon, como se describió, con *C. albicans* o *C. glabrata* vivas o muertas durante 2 horas a una MOI de 1:10, siguiendo una cinética de posinfección de 4, 6, 8 y 10 horas. Después de cada tiempo, se adicionaron 500 µL de TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) a cada uno de los pozos para la extracción de ARN total. El ARN total se trató con DNase II y se precipitó con isopropanol.

Para la retrotranscripción (RT) del ARN se usaron 3 µg de ARN total, al que se le adicionaron 0.5 µg de oligo (dT) (Invitrogen) y se incubaron a 70 °C durante 10 minutos. El master mix para la retrotranscripción se preparó con 1X single strand buffer; 0.5 mM de DTT, 500 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP) (Invitrogen) y 200 U de transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen). Las reacciones de retrotranscripción se

incubaron a 42 °C durante una hora. Después de la formación de cDNA se realizó el qPCR usando un Master Mix con 1.5 mM de MgCl₂ (Ampliqon PCR enzymes & Reagents, Dina-marca) y usando Eva Green (Ampliqon) como fluorocromo. Como gen endógeno se utilizó G3PDH usando los siguientes *primers* específicos: 5'-GGTCATCCATGACAACCTTTGG-3' (*forward*) y 5'-GTCATACCAGGAATTGAGCTTGAC-3' (*reverse*). Los *primers* para la MCP1 fueron 5'-CTCGCTCAGCCAGATGCAAT-3' (*forward*) y 5'-TGCTTGTCAGGTGGTCCAT-3' (*reverse*); para el fragmento de la IL-8 fueron 5'-GCCAAGAGAATATCCGAAC-3' (*forward*) y 5'-TCAACACAGCACTACCAACA-3' (*reverse*); para el TNF- α 5'-GACTTCCTTGAGACACGG-3' (*forward*) y 5'-AGGGCGATTACAGACACA-3' (*reverse*), y para el fragmento de la IL-1 β 5'-GCCCTGTGCCTTAGTAGTAT' (*forward*) y 5'-TGCATCAGCTCATCAATAAC' (*reverse*).

Para los TLRs los *primers* específicos para el fragmento de TLR2 fueron 5'-GGC CAG CAA ATT ACC TGT GTG -3' (*forward*) y 5'-AGG CGG ACA TCC TGA ACC T -3' (*reverse*); para el TLR4 5'-CAG AGT TTC CTG CAA TGG ATC A -3' (*forward*) y 5'-GCT TAT CTG AAG GTG TTG CAC AT- 3' (*reverse*) y, por último, para el TLR6 5'-GAA GAA GAA CAA CCTTT AGG ATA GC-3' (*forward*) y 5'-AGG CAA ACA AAA TGG AAG CTT -3' (*reverse*).

Los genes para todas las citocinas se amplificaron de la siguiente manera, 45 segundos de desnaturación a 95 °C, 45 segundos de alineamiento a 58 °C y 45 segundos de extensión a 72 °C por 35 ciclos.

Interpretación de resultados

Todos los valores numéricos de cada gen se normalizaron con su respectivo valor de gen endógeno G3PDH y los experimentos se calibraron utilizando el nivel basal de la expresión de cada gen como valor inicial (células sin infectar).²⁷

Todos los valores se sometieron al análisis de expresión relativa de $\Delta\Delta C_t$ usando el programa Step One V. 2.3.1 de Life Technologies, Estados Unidos.

Los valores representados en las gráficas correspondieron al promedio de dos experimentos independientes, y representados como la media más el error estándar en porcentaje. Los valores se sometieron a análisis estadístico usando el programa Graph Prism V. 6.0 y la prueba no paramétrica Anova de una vía.

RESULTADOS

Curvas de crecimiento de levaduras de *Candida albicans* y *Candida glabrata* en medio Sabouraud

Se llevó a cabo la cinética de crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida glabrata* en caldo dextrosa Sabouraud por separado; se incubaron a 37 °C, se hicieron lecturas de turbidez cada hora a una longitud de onda de 540 nm durante 24 horas. Las levaduras de *C. albicans* ATCC 10231 mostraron un crecimiento exponencial entre las 5 y 15 horas, mientras que para *C. glabrata* fue de 5 a 11 horas. **Figura 1**

Estimulación de queratinocitos humanos (HaCat) con *C. albicans* y *C. glabrata* (vivas y muertas)

Estimulación de queratinocitos humanos (HaCat) con *C. albicans* y *C. glabrata* vivas

Evaluación de quimiocinas MCP-1 e IL-8

Los resultados de la expresión relativa de las quimiocinas MCP-1 e IL-8, producidas por los queratinocitos HaCaT al ser estimulados con *C. albicans* vivas, evaluados por la técnica RT-qPCR, mostraron un valor alto para IL-8 en comparación con MCP-1 a las 8 horas, siendo de 1600 (IL-8) y 300 (MCP-1) unidades, respectivamente. La expresión de estas quimiocinas, al estimular

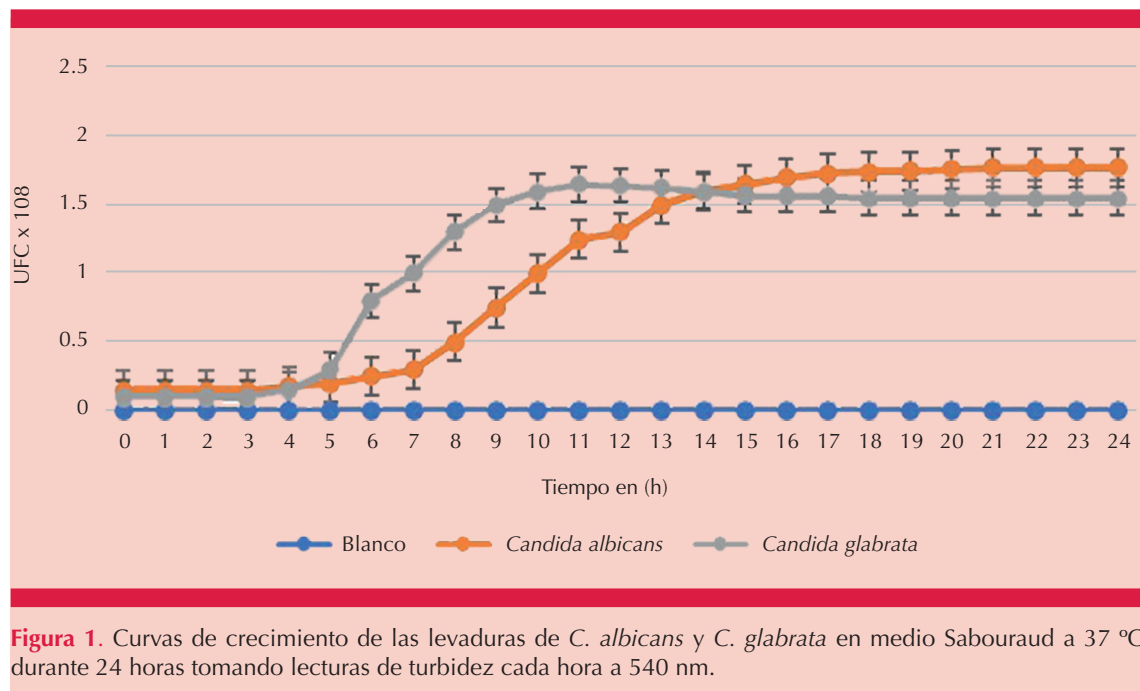


Figura 1. Curvas de crecimiento de las levaduras de *C. albicans* y *C. glabrata* en medio Sabouraud a 37 °C durante 24 horas tomando lecturas de turbidez cada hora a 540 nm.

con *C. glabrata* viva, se observó a las 4 horas para la IL-8 con un valor de 90 QR y para el MCP-1 de 30 QR a las 8 horas, valores muy bajos comparados con los obtenidos al estimular con *C. albicans*. **Figura 2**

Evaluación de TNF- α , IL-1 β y TGF- β

Al estimular con *C. albicans* viva a queratinocitos HaCaT, evaluando la expresión de citocinas proinflamatorias por la técnica RT-qPCR, los valores fueron significativos y mostraron que fue mayor para TNF- α (1800 QR) a las 6 horas en comparación con TGF- β , cuya expresión fue al mismo tiempo, pero en menor cantidad (150 QR), mientras IL-1 β se expresó a tiempos tardíos posinfección (8 horas) en cantidad muy baja (200 QR).

Al analizar la producción de TNF- α , IL-1 β y TGF- β estimulando queratinocitos HaCaT con *Candida glabrata* viva, observamos resultados de expresión relativa bajos en comparación con la

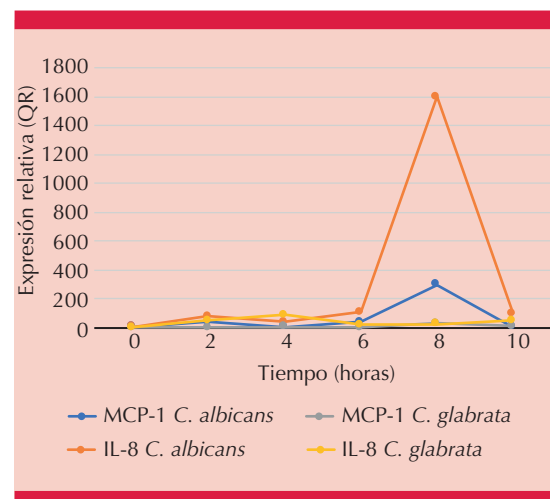


Figura 2. Expresión relativa de las quimiocinas IL-8 y MCP-1 en queratinocitos HaCaT estimulados con las cepas vivas de *C. albicans* ATCC 10231 y *C. glabrata*, evaluados por la técnica RT-qPCR.

* $p < 0.05$.

estimulación con *C. albicans* que dio valores de 90 QR para la IL-1 β a las 4 horas, 40 QR para el

TNF- α a las 2 horas y 15 QR para TGF- β a las 8 horas. La producción de estas citocinas no fue significativa. **Figura 3**

Receptores tipo Toll (TLRs)

Al estudiar la existencia de los receptores tipo Toll en los queratinocitos HaCaT estimulados con la cepa de *C. albicans* ATCC 10231 viva, se observan altos valores de expresión relativa para el TLR6 a las 2, 4, 6 y 8 horas (320, 110, 280, 290 QR, respectivamente), mientras que los TLRs 2 y 4 mostraron valores muy bajos. En el estudio con *C. glabrata* viva los valores de expresión relativa para los TLRs fueron muy bajos en general; destacó el TLR2 (24 QR) y el TLR6 (37 QR) a las 8 horas posestimulación. **Figura 4**

Estimulación de queratinocitos humanos (HaCaT) con cepas de *C. albicans* y *C. glabrata* muertas por calor húmedo

Evaluación de quimiocinas MCP-1 e IL-8

Las quimiocinas (MCP-1 e IL-8) producidas por los queratinocitos HaCaT estimulados por la cepa de *C. albicans* muerta dan valores de expresión relativa muy bajos, pero, al estimular a estas células con *C. glabrata* muerta, muestran un valor de expresión relativa alto para el MCP-1 (250 QR) a las 2 horas, sin dar un valor representativo para la IL-8. **Figura 5**

Evaluación de TNF- α , IL-1 β y TGF- β

La producción de citocinas TNF- α , IL-1 β y TGF- β en queratinocitos HaCaT estimulados con *C.*

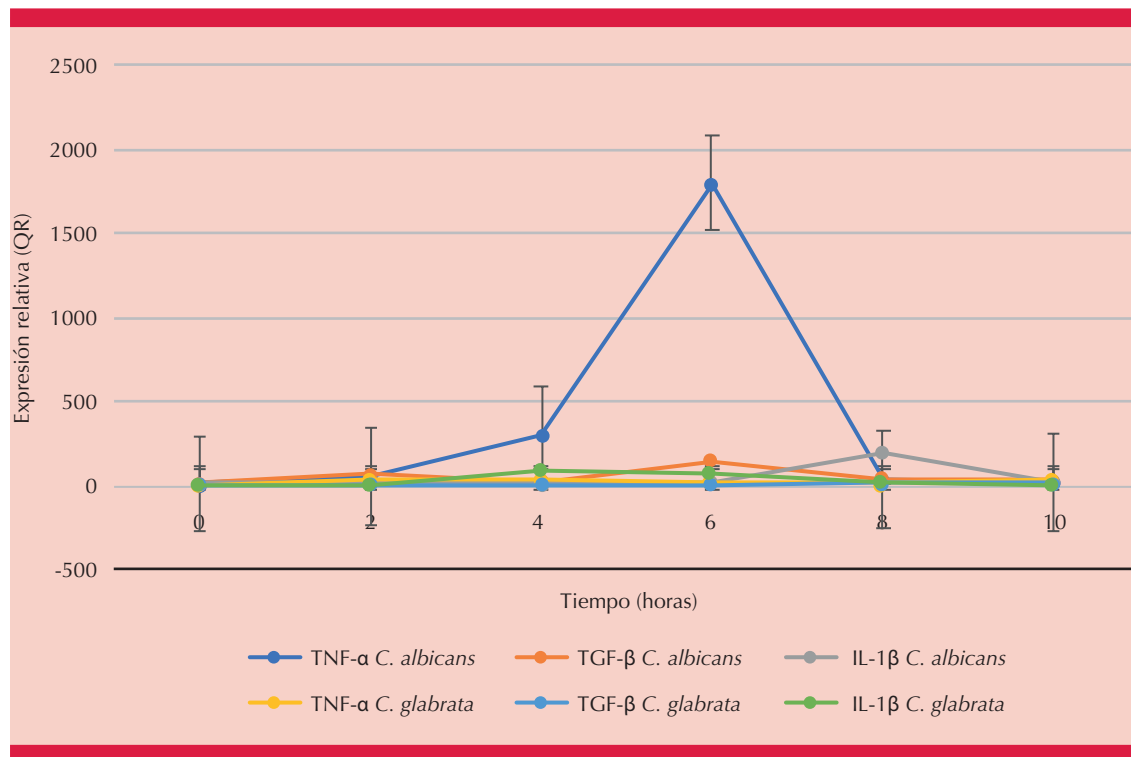


Figura 3. Expresión relativa de citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β y TGF- β en queratinocitos HaCaT estimulados con las cepas vivas de *C. albicans* ATCC 10231 y *C. glabrata* evaluados por la técnica RT-qPCR.

* $p < 0.05$.

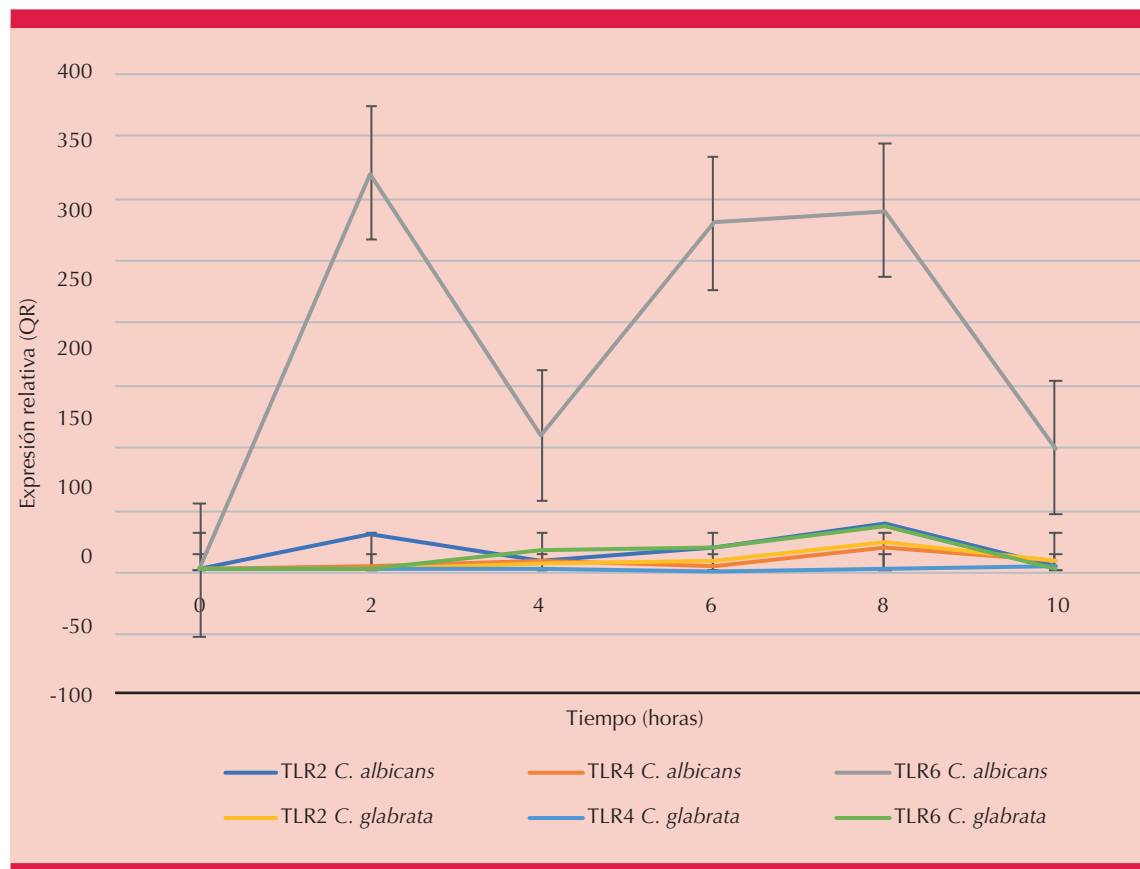


Figura 4. Expresión relativa de receptores tipo Toll (TLR2, TLR4 y TLR6) en queratinocitos HaCaT estimulados con las cepas vivas de *C. albicans* ATCC 10231 y *C. glabrata* evaluados por la técnica RT-qPCR.
* $p < 0.05$.

albicans muerta por calor húmedo mostró que el TNF- α tuvo un valor bajo de expresión relativa (25 QR) a las 2 horas postestimulación, mientras que la IL-1 β se observó a las 4 horas también con un valor de expresión muy bajo (15 QR) y el TGF- α no se produjo. Los valores de expresión relativa en este estudio fueron muy bajos en comparación con la estimulación de la cepa viva.

Al estimular queratinocitos humanos (HaCat) con *C. glabrata* muerta por calor húmedo y observar las citocinas TNF- α , IL-1 β y TGF- β se encontraron valores muy bajos de expresión relativa para las tres citocinas; la de mayor expresión

fue el TGF- β con 13 QR a las 8 horas seguido por el TNF- α , IL-1 β con un valor de 9 QR a las 8 horas. **Figura 6**

Receptores tipo Toll (TLRs)

Los receptores tipo Toll en los queratinocitos HaCaT estimulados con la cepa de *C. albicans* muerta mostraron un valor de expresión relativa alto para el TLR6 a las 8 horas postestimulación (1000 QR), mientras que al estimular con *C. glabrata* muerta sólo se observó un valor de expresión relativa de 100 QR para el TLR6 a las 6 horas postestimulación. **Figura 7**

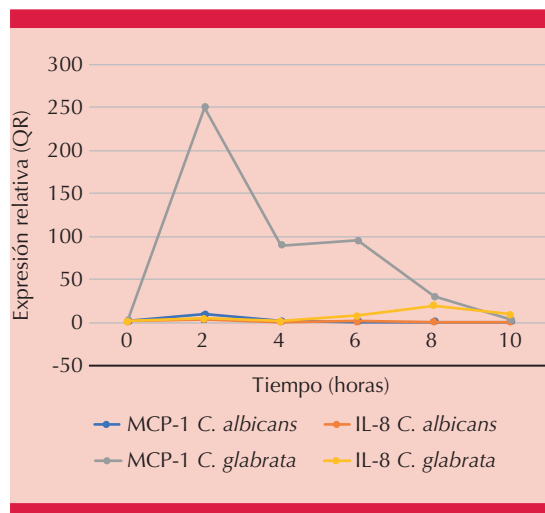


Figura 5. Expresión relativa de las quimiocinas MCP-1 e IL-8 de queratinocitos HaCaT estimulados con las cepas de *C. albicans* ATCC 10231 y *C. glabrata* muertas por calor húmedo, evaluados por la técnica RT-qPCR. * $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

La piel es el órgano más grande del cuerpo; es una barrera física que está formada por diferentes tipos de células con mecanismos de defensa, que se activan cuando existen agresiones en el tejido. Entre los diferentes tipos de células en la piel están los queratinocitos, que son de las primeras células que entran en contacto con agentes patógenos y son capaces de desencadenar una respuesta inmunológica de tipo innata contra éstos mediante la expresión de receptores de superficie. Además, son una fuente importante de producción de citocinas y quimiocinas.²⁸

Por este motivo, en este ensayo se estudió la estimulación de los queratinocitos cuando son expuestos a levaduras del género *Candida* a fin de determinar la expresión de los receptores de superficie tipo Toll y citocinas proinflamatorias,

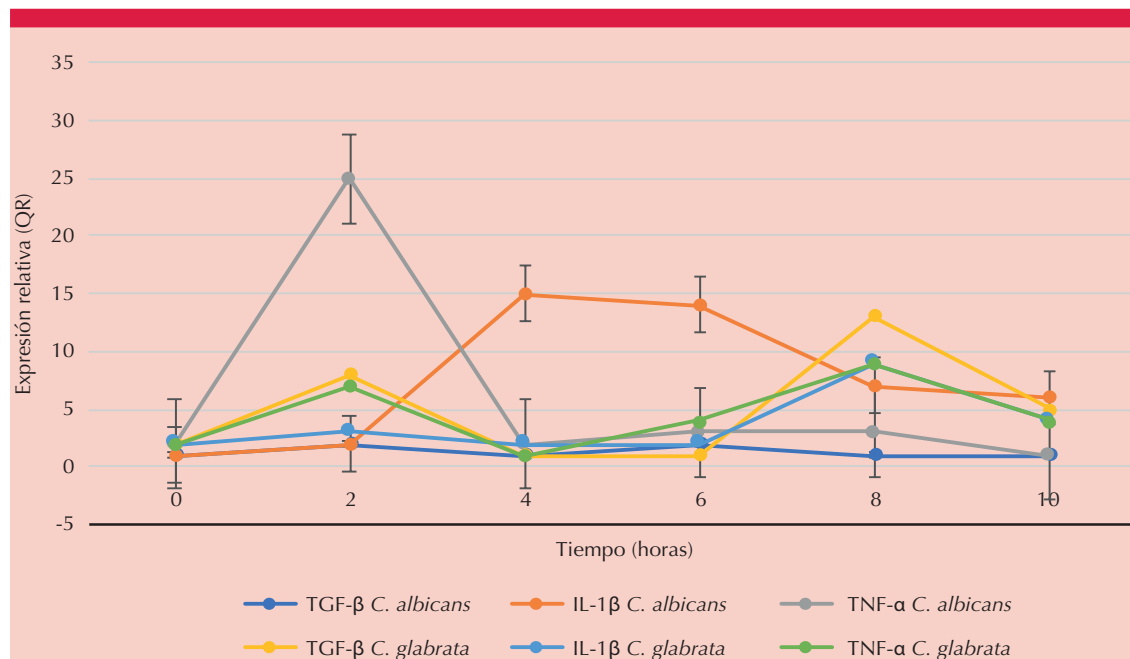
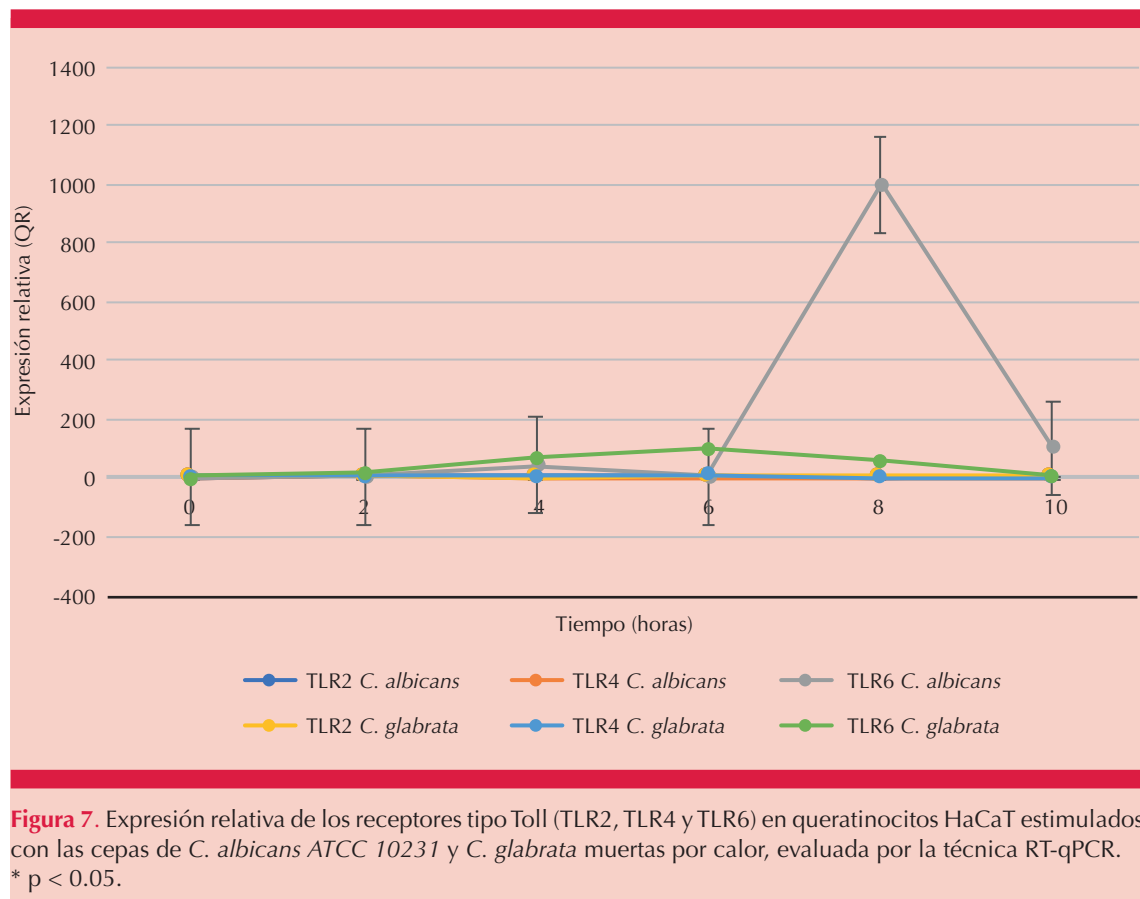


Figura 6. Expresión relativa de las citocinas proinflamatorias TNF-α, IL-1β y TGF-β producidas por queratinocitos HaCaT estimulados con las cepas de *C. albicans* ATCC 10231 y *C. glabrata* muertas por calor, evaluada por la técnica RT-qPCR. * $p < 0.05$.



comparando la respuesta inmunológica de los queratinocitos HaCaT estimulados con levaduras vivas y muertas de dos cepas de *Candida* (*C. albicans* y *C. glabrata*) por separado. **Cuadro 1**

Se observó alta expresión de IL-8, principalmente, en la estimulación con *C. albicans* viva, alcanzando valores de expresión de 1600 QR, importante por la atracción de neutrófilos que son de las primeras células inmunitarias circulantes reclutadas en el sitio de la lesión, donde desempeñan un papel importante en la eliminación microbiana.⁸

El TNF- α dio la mayor expresión relativa (1800 QR), seguido por la IL-1 β (200 QR) y el TGF- β (150 QR). Cuando se estimuló con *C. glabrata* viva el valor para el TNF- α bajó (40 QR).

De acuerdo con la bibliografía, la cepa aislada con mayor frecuencia en los diferentes tipos de candidiasis es *C. albicans*. Se considera la más patógena²⁹ porque tiene varios factores de virulencia y activa el sistema inmunológico innato; específicamente, induce la producción de citoquinas proinflamatorias en varios tipos de células porque es reconocida por muchos receptores, como los tipo Toll (TLRs).^{30,31}

Al estimular con *C. albicans* viva a los queratinocitos HaCaT hay mayor expresión del receptor tipo Toll 6. Al estimular queratinocitos con *C. albicans* muerta por calor, inducen poca expresión de citoquinas, aunque los componentes de la pared celular siguen siendo reconocidos por los receptores tipo Toll 6.^{32,33,34}

Cuadro 1. Comparación de resultados de la estimulación de queratinocitos HaCaT con *C. albicans* o *C. glabrata* (vivas y muertas por calor húmedo)

	QR expresión relativa	Tiempo (horas)		QR expresión relativa	Tiempo (horas)		QR expresión relativa	Tiempo (horas)
<i>C. albicans</i> (viva)								
IL-8	1600	8	TNF- α	1800	6	TLR6	320	2
MCP-1	300	8	IL-1 β	200	8	TLR4	20	8
			TGF- β	150	6	TLR2	40	8
<i>C. albicans</i> (muerta)								
IL-8	4	2	TNF- α	25	2	TLR6	1000	8
MCP-1	10	2	IL-1 β	15	4	TLR4	3	4
			TGF- β	2	2	TLR2	2	2
<i>C. glabrata</i> (viva)								
IL-8	90	4	TNF- α	40	4	TLR6	37	8
MCP-1	30	8	IL-1 β	90	4	TLR4	5	10
			TGF- β	15	8	TLR2	24	8
<i>C. glabrata</i> (muerta)								
IL-8	20	8	TNF- α	9	8	TLR6	100	6
MCP-1	250	2	IL-1 β	9	8	TLR4	7	6
			TGF- β	13	8	TLR2	4	2

En este estudio se observó mayor expresión de IL-8 y MCP-1 cuando las levaduras de ambas cepas están vivas; la participación de este grupo de quimiocinas se ha reconocido de manera muy importante en el fenómeno inflamatorio porque son las encargadas de reclutar e inducir la activación de neutrófilos en el sitio de infección por *Candida*.^{33,34}

Kiyoura y colaboradores³¹ mostraron que levaduras del género *Candida*, al estar muertas por calor, pierden la actividad de un grupo de proteínas catalogadas como factores de virulencia, que participan en el reconocimiento de las levaduras por parte de los receptores TLR2 y TLR4. En este trabajo se demostró que las levaduras muertas por calor inducen concentraciones bajas de los receptores TLR2 y TLR4; sin embargo, TLR6 muestra valores significativos de expresión relativa (1000 QR con la estimulación con *Candida albicans* muerta y 100 QR con la estimulación con *Candida glabrata* muerta) a las

8 y 6 horas de estimulación, respectivamente; asimismo, muestran valores de expresión relativa muy bajos para las citocinas proinflamatorias y también para las quimiocinas.

CONCLUSIONES

La estimulación de la respuesta inmunitaria innata de queratinocitos HaCaT por *C. albicans* o por *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*) se favorece ante levaduras vivas. Las citocinas proinflamatorias, como el TNF- α , y las quimiocinas secretadas (IL-8 y MCP-1) muestran títulos más altos con *Candida albicans*. El receptor Toll que se registra con mayor presencia es el 6 en ambas cepas de levaduras.

REFERENCIAS

1. Reyes MDR, Duarte E, Martínez H, et al. Estado actual de la etiología de la candidiasis en México. Rev Iberoam Micol 2017; 34 (4): 203-210. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.05.001>

2. Beardsley J, Kin HY, Dao A, et al. *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*): A systematic review of clinical and microbiological data from 2011 to 2021 to inform the World Health Organization Fungal Priority Pathogens List. *Med Mycol* 2024;62(6):myae041. <https://doi.org/10.1093/mmy/myae041>
3. Katsipoulaki M, Stappers M, Malavia JD, et al. *Candida albicans* and *Candida glabrata*: global priority pathogens. *Microbiol Mol Biol* 2024; 88 (2): E0002123. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00021-23>
4. Rodríguez P, García B. Candidiasis cutaneomucosas. Manifestaciones clínicas. *Med Clín.* 2006;126(S1):20-24. <https://doi.org/10.1157/13097521>
5. R AN, Rafiq NB. Candidiasis. 29 de mayo 2023. En: StatPearls [Internet]. Isla del Tesoro (FL): StatPearls. Publishing; 2025.
6. Kim YJ, Jang ER, Lee JC, Seo SJ, et al. Diarylheptanoid hirsutenoxime inhibits toll-like receptor 4-mediated NF- κ B activation regulated by Akt pathway in keratinocytes. *Am J Chin Med* 2010; 38 (6): 1207-22. <https://doi.org/10.1142/S0192415X10008573>
7. Piipponen M, Li D, Landén NX. The immune functions of keratinocytes in skin wound healing. *Int J Mol Sci* 2020; 21 (22): 8790. <https://doi.org/10.3390/ijms21228790>
8. Li D, Peng H, Qu L, et al. miR-19a/b and miR-20a promote wound healing by regulating the inflammatory response of keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2021; 141 (3): 659-671. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.06.037>
9. Sarkis S, Stéphan F. Sistema inmunitario cutáneo, EMC - Dermatología 2022; 56 (3): 1-10. [https://doi.org/10.1016/S1761-2896\(22\)46752-5](https://doi.org/10.1016/S1761-2896(22)46752-5)
10. Alcalá P, Montserrat V, Jurado S. Receptores tipo Toll en dermatología. *Rev Cent Dermatol Pascua* 2013; 22 (2): 56-62.
11. Bacharewicz J, Reduta T, Flisiak I. The role of Toll-like receptors in skin diseases. *Semantic Scholar* 2014; 101: 309-318. <https://doi.org/10.5114/dr.2014.4512>
12. Matsumoto C, Oda T, Yokoyama S, et al. Toll-like receptor 2 heterodimers, TLR2/6 and TLR2/1 induce prostaglandin E production by osteoblasts, osteoclast formation and inflammatory periodontitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 428 (1): 110-5. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.10.016>
13. Ren C, Zhang Q, de Haan BJ, et al. Identification of TLR2/TLR6 signalling lactic acid bacteria for supporting immune regulation. *Scient Rep* 2016; 6: 34561. <https://doi.org/10.1038/srep34561>
14. Choteau L, Vancraeynest H, Le Roy D, et al. Role of TLR1, TLR2 and TLR6 in the modulation of intestinal inflammation and *Candida albicans* elimination. *Gut Pathog* 2017; 9: 9. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0158-0>
15. Parque BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med* 2013; 45 (12): E66. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.97>
16. Kang JY, Nan X, Jin MS, et al. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* 2009; 31 (6): 873-84. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.018>
17. Vadillo E, Pelayo R. Los receptores tipo Toll en el desarrollo y función del sistema hematopoyético. *Rev Invest Clín* 2012; 64 (5): 461-476.
18. Marzano AV, Mercogliano M, Borghi A, et al. Cutaneous infection caused by *Salmonella typhi*. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003; 17 (5): 575-7. <https://doi.org/10.1046/j.1468-3083.2003.00797.x>
19. Hernández JC, Montoya CJ, Urcuqui IS. Papel de los receptores tipo toll en las infecciones virales: el VIH-1 como modelo. *Biomédica* 2007; 27: 280-93. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i2.225>
20. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4 (7): 499-511. <https://doi.org/10.1038/nri1391>
21. Curry JL, Qin JZ, Bonish B, et al. Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127 (2):178-186. <https://doi.org/10.5858/2003-127-178-IIRIN>
22. Liu L, Zhou X, Shi J, et al. Toll-like receptor-9 induced by physical trauma mediates release of cytokines following exposure to CpG motif in mouse skin. *Immunology* 2003; 110 (3): 341-347. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01739.x>
23. Le Bitoux M, Haftek M. Fisiología cutánea: queratinización epidérmica. *EMC- Podología* 2008; 10 (3): 1-10. [https://doi.org/10.1016/S1762-827X\(08\)70695-3](https://doi.org/10.1016/S1762-827X(08)70695-3)
24. Fernández GA, Lizana MAM, Del Mar de Pablos RM, et al. Optimización del cultivo de queratinocitos humanos para el desarrollo de un modelo de piel artificial humana: alternativas celulares como capa alimentadora. *Actual Med* 2016; 101 (798): 85-94. <https://doi.org/10.15568/am.2016.798.or04>
25. Peirson SN, Mayordomo JN. Quantitative polymerase chain reaction. *Métodos Mol Biol* 2007; 362: 349-62. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-257-1_25
26. Dutta D, Naiyer S, Mansuri S, et al. COVID-19 diagnosis: A comprehensive review of the RT-qPCR method for detection of SARS-CoV-2. *Diagnostics* 2022; 12 (6):1503. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061503>
27. Guzmán CS, Aguilar NO, Cano ALM, Sánchez SO. Variability of the nuclear gene G3pdh in *Jatropha curcas* L. *Polibotánica* 2015;40:99-107. ISSN 2395-9525. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.40.6>
28. Castrillón RLE, Palma RA, Padilla DC. La función inmunológica de la piel. *Dermatol Rev Mex* 2008; 52 (5): 211-24.
29. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001; 9 (7): 327-35. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02094-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02094-7)

30. Pivarcsi A, Nagy I, Kemeny L. Innate immunity in the skin: how keratinocytes fight against pathogens. *Curr Immunol Rev* 2005; 1 (1): 29-42. <https://doi.org/10.2174/1573395052952941>
31. Kiyoura Y, Tamai R. Innate immunity to *Candida albicans*. *Japan Dental Sci Rev* 2015; 51 (3): 59-64. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2014.12.001>
32. Durán A, Álvarez M, Valero N. Papel de los receptores tipo toll (TLRs) y receptores para dominios de oligomerización para la unión a nucleótidos (NLRs) en las infecciones virales. *Invest Clin* 2014; 55 (1): 61-81.
33. Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol* 2001; 9 (12): 591-6. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(01\)02237-5](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(01)02237-5)
34. Whibley N, Gaffen SL. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-albicans *Candida* species. *Cytokine* 2015; 76 (1): 42-52. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.07.025>

