

Presencia de la enzima β -glucuronidasa de neutrófilos en pacientes con esporotricosis

Presence of the enzyme β -glucuronidase of neutrophils in patients with sporotrichosis.

Alejandro Palma-Ramos,¹ Karla Tepexpan-Chavarría,¹ Mary Carmen González-Hernández,¹ Araceli Monroy-Núñez,¹ Laura E Castrillón-Rivera,¹ Jorge Ismael Castañeda-Sánchez,¹ Elisa Vega-Memije,² Roberto Arenas-Guzmán³

Resumen

ANTECEDENTES: La esporotricosis es una infección fúngica crónica causada por el complejo *Sporothrix schenckii*; en la histopatología muestra granulomas supurativos, tuberculoideos o de cuerpo extraño, formados por histiocitos que rodean un área central de neutrófilos que contribuyen en el sistema de inmunidad inespecífica, en estas células se encuentra la enzima β -glucuronidasa que cataliza la descomposición de los carbohidratos complejos, hidrolizando los residuos de ácido β -D-glucurónico del extremo no reductor de los mucopolisacáridos.

OBJETIVO: Determinar la existencia de la enzima β -glucuronidasa proveniente de neutrófilos en cortes histológicos de siete pacientes diagnosticados con esporotricosis por el departamento de Dermatología y Micología del Hospital General Manuel Gea González de la Secretaría de Salud.

MATERIAL Y MÉTODO: Estudio prospectivo efectuado de enero a diciembre de 2019 en el que se utilizaron siete estudios histopatológicos y se efectuaron tres cortes por muestra, para la realización de las técnicas: hematoxilina-eosina, PAS y para el marcaje de β -glucuronidasa; 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 IgG policlonal anti- β -glucuronidasa humana hecho en cabra por los laboratorios Santa Cruz Biotechnology.

RESULTADOS: Se encontró β -glucuronidasa adherida a las levaduras de *Sporothrix* sp, previamente observadas por la reacción de PAS en todos los cortes estudiados.

CONCLUSIONES: Se encontró β -glucuronidasa proveniente de polimorfonucleares neutrófilos, adherida en la pared celular de las levaduras presentes en los cortes histológicos de los siete pacientes con esporotricosis.

PALABRAS CLAVE: *Sporothrix schenckii*; esporotricosis cutánea; β -glucuronidasa.

Abstract

BACKGROUND: *Sporotrichosis* is a chronic fungal infection caused by the *Sporothrix schenckii* complex, characterized by a suppurative, tubercloid or foreign body granulomas, formed by histiocytes that surround a central area of neutrophils that contribute to the nonspecific immunity system, in these cells it is found the enzyme β -glucuronidase that catalyzes the breakdown of complex carbohydrates, hydrolyzing β -D-glucuronic acid residues from the non-reducing end of mucopolysaccharides.

OBJECTIVE: To determine the presence of the enzyme β -glucuronidase from neutrophils in histological sections of biopsies of seven patients diagnosed with sporotrichosis by the Dermatology and Mycology Department at Manuel Gea González General Hospital of public health.

MATERIAL AND METHOD: A prospective study done from January to December 2019 in which seven patient histopathological samples were used and three cuts per sample were made for the performance of the techniques: HE, PAS and for the label-

¹ Laboratorio de Inmunobiología. Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Ciudad de México.

² Departamento de Dermatología.

³ Sección de Micología. Hospital General Dr. Manuel Gea González, Ciudad de México.

Recibido: enero 2020

Aceptado: marzo 2020

Correspondencia

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

Este artículo debe citarse como

Palma-Ramos A, Tepexpan-Chavarría K, González-Hernández MC, Monroy-Núñez A y col. Presencia de la enzima β -glucuronidasa de neutrófilos en pacientes con esporotricosis. Dermatol Rev Mex. 2020; 64 (6): 643-649.

ing of β -glucuronidase; the commercial package Cell and Tissue Staining Kit, Goat Kit HRP-AEC System was used (catalog number CTS009) R&D Systems, and the primary antibody was goat human anti- β -glucuronidase polyclonal IgG by the Santa Cruz Biotechnology laboratories.

RESULTS: It was found the presence of β -glucuronidase adhered to the yeasts of *Sporothrix sp.*, previously observed by the PAS reaction in all the samples.

CONCLUSIONS: We found β -glucuronidase from neutrophil polymorphonuclear, adhered to the cell wall of the yeasts present in the histological sections of the seven patients with sporotrichosis.

KEYWORDS: *Sporothrix schenckii*; Cutaneous sporotrichosis; β -glucuronidase.

ANTECEDENTES

La esporotricosis es la micosis subcutánea más común en México. Por lo general, se adquiere por inoculación traumática, a través de heridas o por inhalación de esporas a través de las vías respiratorias superiores y es causada por especies del complejo *Sporothrix schenckii*.¹ También se ha reportado la transmisión zoonótica en lesiones por arañazos, mordeduras de gatos o armadillos.² Aproximadamente 10 a 62% de los pacientes relacionan la infección con un traumatismo penetrante reciente con espinas de plantas, astillas de madera o material orgánico contaminado.³ La diseminación a estructuras osteoarticulares y vísceras es poco común y parece ocurrir con mayor frecuencia en pacientes con antecedentes de abuso de alcohol o inmunosupresión, especialmente pacientes con SIDA.⁴ *Sporothrix schenckii* en su pared celular tiene dos antígenos (ramno-mananas), formados por un glucopéptido constituido por una fracción polisacárida con manosa, galactosa, glucosa y L-ramnosa y una fracción peptídica que está compuesta por treonina, serina, ácido aspártico y ácido glutámico. Se ha propuesto que la fracción polisacárida es la responsable de la antigenicidad.^{5,6}

Los hallazgos histopatológicos de la esporotricosis son: granulomas supurativos con neutrófilos, histiocitos y células gigantes, rodeadas por linfocitos y plasmocitos.⁷ Los neutrófilos están en

la primera línea de defensa contra infecciones, trabajan principalmente a través de la fagocitosis de moléculas tóxicas, así como la liberación de enzimas que son cada vez más importantes por su contribución a la regulación en el desarrollo de la respuesta inmunitaria inflamatoria.⁸ La degranulación de los gránulos azurófilos se realiza una vez que se forma la vacuola fagocítica durante el proceso de la fagocitosis. La mieloperoxidasa en los gránulos azurófilos es de gran importancia para el correcto funcionamiento del sistema bactericida dependiente de oxígeno y junto con esta enzima se encuentran también en estos granos defensinas y otras enzimas, como la β -glucuronidasa, lisozima y la elastasa, entre otras.⁹

La β -glucuronidasa humana es miembro de la familia de enzimas glucosidasas que provocan la descomposición de los carbohidratos complejos y catalizan la hidrólisis de los residuos del ácido β -D-glucurónico del extremo no reductor de los mucopolisacáridos (también conocidos como glucosaminoglucanos), como el sulfato de heparán, así como la hidrólisis selectiva de los enlaces beta-glucosidurónicos y los grupos arilo, acilo o alcohol, degradando paredes celulares de microorganismos.¹⁰

El objetivo de este artículo es determinar la existencia de la enzima β -glucuronidasa proveniente de neutrófilos en cortes histológicos de biopsias

de pacientes con esporotricosis diagnosticados por el departamento de Dermatología y Micología del Hospital General Manuel Gea González de la Secretaría de Salud.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo efectuado de enero a diciembre de 2019 en el que se utilizaron siete bloques de parafina con tejido de pacientes con diagnóstico de esporotricosis, atendidos en el Hospital General Dr. Manuel Gea González. Se realizaron tres cortes por muestra, uno para la realización de la tinción con hematoxilina y eosina (H y E), otro para la técnica de ácido peryódico de Schiff (PAS) y el tercero para el marcaje de β -glucuronidasa.

Técnica para la tinción con hematoxilina-eosina¹¹

Con el tejido ya desparafinado, colorear con hematoxilina de Harris durante un minuto y lavar; posteriormente, diferenciar con alcohol-ácido, lavar y virar con agua amoniacal; luego, lavar nuevamente, colorear con eosina durante 30 segundos, deshidratar y montar.

Técnica para la tinción de ácido peryódico-Schiff (PAS)¹²

Las muestras se desparafinan y tratan con ácido peryódico a 0.6% durante 10 minutos; se lavan, secan y se agrega reactivo de Schiff por 15 minutos en la oscuridad; después se lavan con agua sulfurosa y con agua destilada. Se colorean con hematoxilina de Harris uno o dos minutos y luego se lavan, se adiciona amarillo de metilo durante tres minutos, se lavan con agua acidulada y destilada. Se deshidratan y montan.

Las estructuras y compuestos PAS positivos (polisacáridos) se observan de color rosa.

Marcaje por inmunohistoquímica para la detección de β -glucuronidasa *in situ*

Se utilizó el anticuerpo anti- β -glucuronidasa humana hecho en cabra, la interacción se reveló utilizando el paquete comercial (Cell and Tissue Staining Kit, Goat Kit, HRP-AEC System by R&D Minneapolis, Mn, USA Cat No. CTS009): Desparafinar y dejar la muestra durante cinco minutos con una a tres gotas de bloqueador de peroxidasa, lavar con PBS durante cinco minutos, incubar con una a tres gotas de bloqueador de suero durante 15 minutos, incubar con una a tres gotas de bloqueador de avidina durante 15 minutos, lavar, incubar con una a tres gotas de bloqueador de biotina durante 15 minutos, lavar, incubar con el anticuerpo primario (anti- β -glucuronidasa humana hecho en cabra), a una concentración 1:50, durante 30 minutos a 37°C y posteriormente refrigerar durante 24 horas, lavar tres veces, incubar con una a tres gotas de anticuerpo secundario anti-cabra biotinizado (865003) durante 60 minutos, lavar, Incubar con una a tres gotas de HSS-HRP (conjugado de estreptavidina) durante 30 minutos, lavar, adicionar el cromógeno AEC (3-amino-9-etilcarbazol) necesario (de 100-200 μ L), durante 20 minutos, lavar, colocar hematoxilina de Mayer y montar con solución acuosa de montaje.

RESULTADOS

Se obtuvieron 21 laminillas de las 7 muestras, el diagnóstico histopatológico de esporotricosis se efectuó mediante las técnicas de hematoxilina-eosina y PAS al observar las levaduras en los tejidos de los pacientes.

Se presentaron los patrones granulomatosos descritos en todos los casos y la existencia de levaduras teñidas con PAS en todas las muestras (**Figuras 1 y 2**).

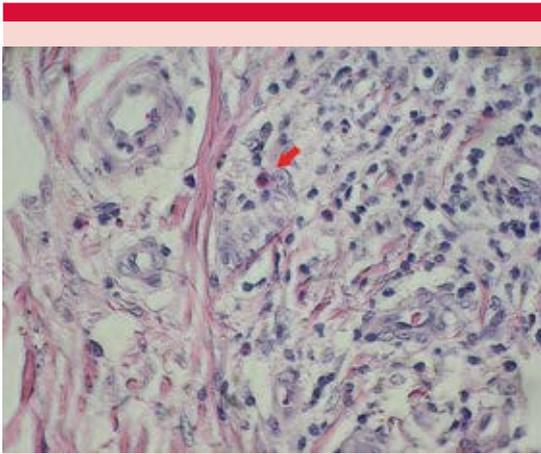


Figura 1. Levaduras de *Sporothrix* sp en tejido de paciente observadas por la técnica de hematoxilina eosina a 40x.

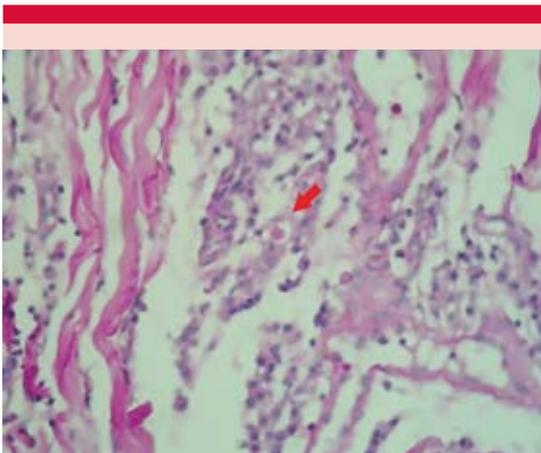


Figura 2. Levaduras en color rosa de *Sporothrix* sp en tejido de paciente, observadas por la técnica de PAS a 40x.

Se realizó la técnica inmunohistoquímica para la detección de β -glucuronidasa, en las muestras que resultaron positivas al encontrarse levaduras de *Sporothrix schenckii* observadas por la técnica de PAS.

La coloración roja muestra la existencia de β -glucuronidasa ya que se usó la técnica de avidina-biotina y peroxidasa (**Figura 3**).

Se observó la enzima β -glucuronidasa adherida a las levaduras de *Sporothrix schenckii*, presentes en todos los pacientes diagnosticados con esporotricosis estudiados. Esta observación demuestra la capacidad de este hongo para activar la respuesta inmunitaria innata.

DISCUSIÓN

La esporotricosis es una micosis que afecta a huéspedes mamíferos, incluidos los seres humanos, y es causada por especies patógenas de género *Sporothrix*.¹³ Estos organismos tienen la capacidad de sufrir dimorfismo, pasando de un mohó que crece en el ambiente a levaduras al infectar tejidos del huésped.¹⁴ La forma cutánea es la más frecuente y clásica después de una o dos semanas de la inoculación del hongo.¹⁵

Ante la sospecha diagnóstica de una lesión por esporotricosis, el abordaje es: la biopsia de la lesión se divide en dos fragmentos: uno se utiliza para el cultivo y el otro se fija en formaldehído al 10% para ser procesada en el laboratorio de histología, el resultado se obtiene cuando el patólogo examina meticulosamente los cortes teñidos con hematoxilina-eosina, ácido-peryódico de Schiff (PAS) y metenamina plata de Gomori (GG). La primera técnica es útil para valorar la respuesta inflamatoria supurativa y granulomatosa con pequeños cúmulos de polimorfonucleares neutrófilos, rodeados por células epitelioides, linfocitos y células gigantes multinucleadas.^{7,16}

Los neutrófilos constituyen 60 a 70% de todos los leucocitos en sangre periférica y algunos están presentes en el tejido conectivo; según la morfología del núcleo se distinguen dos tipos: células en banda y células segmentadas; las primeras son neutrófilos jóvenes, cuyo núcleo

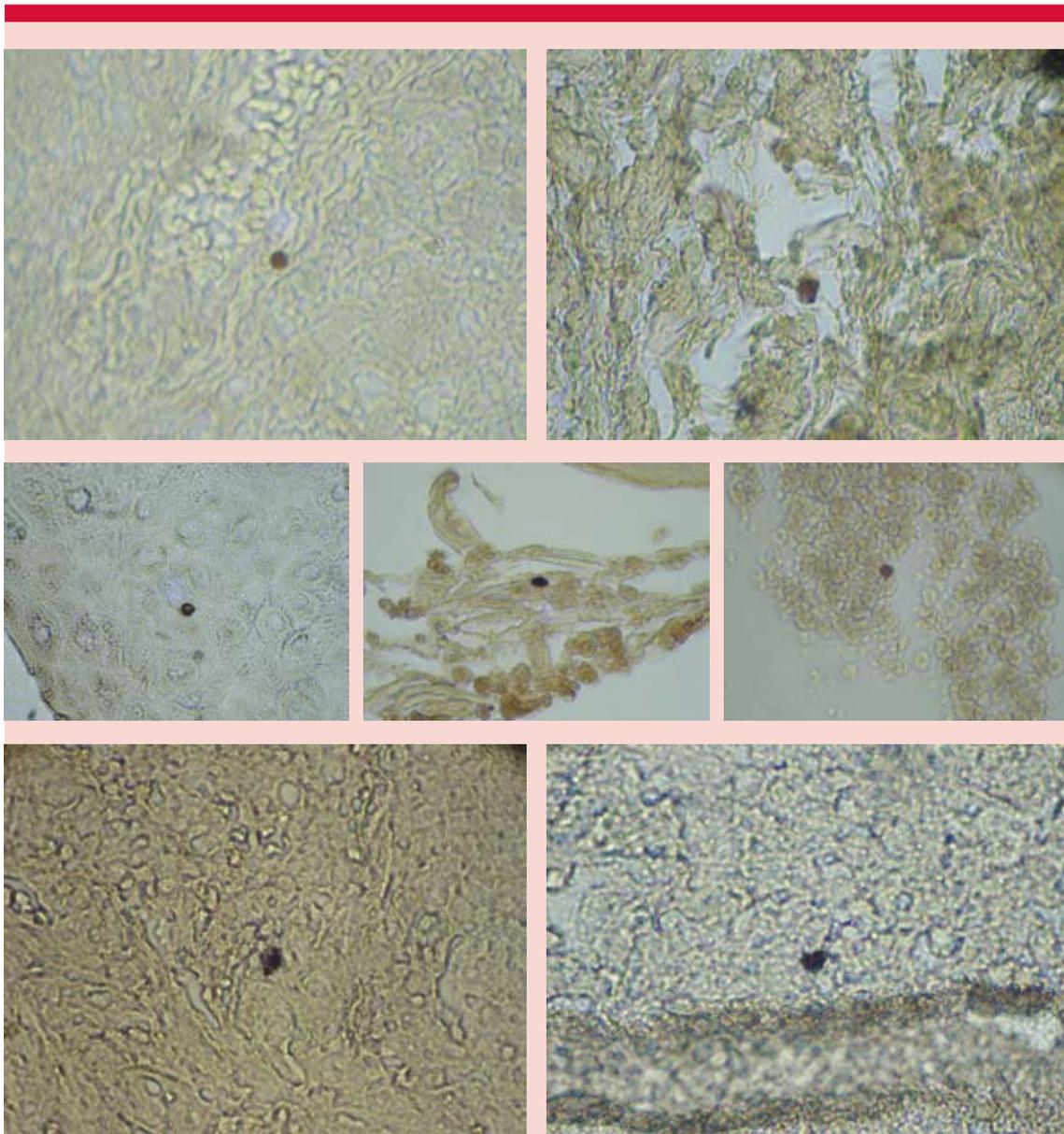


Figura 3. β -glucuronidasa en siete pacientes diagnosticados con esporotricosis cutánea.

está indentado; en las segundas, formas maduras, se observa el núcleo constituido por un número de lóbulos que varía entre 2 y 5, conectados por finos filamentos de cromatina. Tienen diámetro aproximado de 10-20 mm y se distinguen por

presentar un núcleo multilobulado visible al microscopio óptico con tinción Giemsa. Los neutrófilos no tienen nucléolo y no pueden dividirse ni diferenciarse. En el citoplasma contienen gran número de gránulos. Hay tres tipos de gránulos

que pueden distinguirse por los distintos componentes que contienen.¹⁷ Nombrados por el orden de aparición en las células progenitoras de la médula ósea son los siguientes: primarios o azurófilos, secundarios o secretorios o específicos y terciarios. Los gránulos primarios o azurófilos son lisosomas que contienen las enzimas necesarias para la digestión intracelular y diversos compuestos con actividad bactericida (fosfatasa ácida, arilsulfatasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, lisozima, mieloperoxidasa, proteínas catiónicas), los gránulos secundarios o específicos contienen lisozima, proteasas neutras [colagenasa]), fosfatasa alcalina y lactoferrina. Y, por último, los gránulos terciarios o de gelatinasa. La función primordial de los neutrófilos es la defensa del huésped, específicamente la fagocitosis y destrucción de los agentes patógenos en los tejidos. La célula responde a estímulos quimiotácticos generados en el tejido afectado que inducen la adherencia a las células endoteliales y diapédesis a través de la pared de los vasos de la microcirculación hacia el lugar de la lesión, donde intentará destruir al agente causante de ésta. Por eso, el proceso de acumulación de los neutrófilos en los tejidos para la defensa del huésped es esencial para la supervivencia.¹⁸ Esto explicaría la formación de granulomas supurativos, compuestos en el centro por neutrófilos que rodean al agente patógeno, en este caso la levadura de *Sporothrix*.

La β -glucuronidasa es una enzima responsable de la degradación de glucosaminoglucanos,¹⁰ ya que la pared celular de *Sporothrix schenckii* tiene dos antígenos (ramno-mananas); uno proviene de la fase micelial y el otro de la fase de levadura, formados por un glucopéptido constituido por una fracción polisacárida con manosa, galactosa, glucosa y L-ramnosa y que también hay existencia de quitina perteneciente al grupo de los glucosaminoglucanos, la β -glucuronidasa actúa degradando la pared de la levadura provocando su lisis.

Como el objetivo de este trabajo fue determinar la existencia de la enzima β -glucuronidasa proveniente de neutrófilos en cortes histológicos de biopsias de pacientes con esporotricosis, pudimos demostrar esta enzima unida a las levaduras en los cortes de todos los pacientes estudiados; por lo que inferimos que la finalidad de la existencia de esta enzima es destruir la pared celular y ayudar a eliminar al agente patógeno. Esta observación demuestra la capacidad de este hongo para activar la respuesta inmunitaria innata.

CONCLUSIÓN

Se encontró β -glucuronidasa proveniente de polimorfonucleares neutrófilos, adherida en la pared celular de las levaduras presentes en los cortes histológicos de los siete pacientes con esporotricosis.

REFERENCIAS

1. Vázquez del Mercado E, Arenas GR, Padilla DC. Sporotrichosis. Clin Dermatol 2012; 30 (4): 437-443. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.09.017
2. Ramos SM, Vasconcelos C, Carneiro S, Cestari T. Sporotrichosis. Clin Dermatol 2007; 25 (2): 181-187. doi: 10.1016/j.clindermatol.2006.05.006
3. Alves SH, Aurélio PL, Tecchio MZ. Subcutaneous bilateral sporotrichosis: a rare presentation. Mycopathologia 2004; 158: 285-287.
4. Kauffman CA, Bustamante B, Chapman SW, Pappas PG. Clinical Practice Guidelines for the Management of Sporotrichosis: 2007 Update by the Infectious Diseases Society of America. IDSA Guidelines. CID 2007; 45: 1255-1265.
5. Saúl A, Bonifaz A. Clasificación de la esporotricosis. Una propuesta con base en el comportamiento inmunológico. Dermatol Rev Mex 2011; 55 (4): 200-208.
6. Fernandes KS, Mathews HT, Lopes BL. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. J Med Microbiol 1999; 48 (2): 195-203. doi: 10.1099/00222615-48-2-195.
7. Carrada BT. Esporotricosis: Avances recientes en el diagnóstico de laboratorio, histopatología y la epidemiología en México. Rev Mex Patol Clin Med Lab 2012; 59 (3): 147-171.
8. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. Front Immunol 2014; 5: 508. doi: 10.3389/fimmu.2014.00508

9. Mollinedo, F. Human neutrophil granules and exocytosis molecular control. *Immunología*. 2003; 22 (4): 340-358.
10. William NL, Barshop B, Ozand P. Atlas de enfermedades metabólicas. 2ª ed. Londres: Hodder Arnold, 2005; 501-503.
11. Cormack DH. La histología y sus métodos de estudio. En: *Histología de HAM*. México: Interamericana, 1987; 1-28.
12. Spannhof L. Hidratos de carbono: histoquímica práctica. Gustav Fishera Verlag Jena, 1964; 17-43.
13. Lopes B, Mora MH, Zhang Y, Nino VG, Messias RA, Pires CZ, Hoog S. Sporotrichosis between 1898 and 2017: the evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. *Medical Mycology* 2018; 56: 126-143.
14. Mora MH, Dantas AS, Trujillo EE, de Souza BA, Lopes BL. Current progress in the biology of members of the *Sporothrix schenckii* complex following the genomic era. *FEMS Yeast Res* 2015; 15 (6): Pii:fov065. doi: 10.1093/femsyr/fov065
15. Padilla DM, Medina CD, Cortés LN. Esporotricosis en edad pediátrica: experiencia del Centro Dermatológico Pascua. *Piel* 2004; 19: 350-363. DOI: 10.1016/S0213-9251(04)72870-1
16. Kinbara T, Fukushiro R. Fungal elements in tissues of sporotrichosis. *Mykosen* 1983; 26: 35-41. doi: 10.1111/j.1439-0507.1983.tb03936.x
17. Borregaard, N. Cowland, J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997; 89: 3503-3521 5. <https://doi.org/10.1182/blood.V89.10.3503>
18. Faurshou, M. and Borregaard, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 2003; 5: 1317-1327. doi: 10.1016/j.micinf.2003.09.008

Dermatología Comunitaria México AC

Comunica con mucho agrado a todos los interesados, la apertura de su página web que pone a su disposición en la dirección: dermatologiacomunitaria.org.mx

Nuestro objetivo es dar a conocer: quiénes somos, nuestra historia desde los inicios, las etapas por las que hemos atravesado, quiénes han participado en nuestras actividades, las instituciones que nos han apoyado. Cuál es nuestra visión y razón de ser, entre lo que destaca la atención dermatológica a los grupos marginados, la enseñanza constante de la dermatología básica al personal de salud del primer nivel de atención en las áreas remotas y la investigación. Aunque los problemas dermatológicos no son prioritarios por su letalidad, sí lo son por su enorme frecuencia y la severa afectación en la calidad de vida de los que los padecen.

Les mostramos la estructura de nuestros cursos y cómo los llevamos a cabo.

La sección de noticias comparte con los interesados nuestro quehacer mes con mes y el programa anual tiene como objetivo invitarlos a participar en nuestras actividades.

Desde enero de este año está funcionando el Centro Dermatológico Ramón Ruiz Maldonado para personas de escasos recursos y para recibir a los pacientes afectados por las así llamadas enfermedades descuidadas *neglectas*, que nos envía el personal de salud que trabaja en las áreas remotas. Se encuentra ubicado temporalmente en el Fraccionamiento Costa Azul del puerto de Acapulco.

Con un profundo sentido de amistad y reconocimiento le hemos dado este nombre para honrar la memoria de quien fuera uno de los dermatólogos más brillantes de nuestro país, que alcanzó reconocimiento nacional e internacional. Además de haber alentado nuestras actividades participó, acompañado de su familia, en muchas de nuestras jornadas en las comunidades.

En la sección "Contacto" esperamos sus comentarios y sugerencias.

Dr. Roberto Estrada Castañón