

GACETA MÉDICA DE MÉXICO

BIOLOGÍA MOLECULAR Y MEDICINA

Presencia de lactoferrina (LF) en la esporotricosis linfocutánea. Péptido antimicrobiano unido a levaduras

Alejandro Palma-Ramos¹, Laura E. Castrillón-Rivera¹, María Elisa Vega-Mémije², Roberto Arenas-Guzmán³ y Lucía Rangel-Gamboa^{4*}

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

²Subdirección de Investigación, Hospital General Dr. Manuel Gea González; ³Servicio de Micología, Hospital General Dr. Manuel Gea González;

⁴Departamento de Ecología de Agentes Patógenos, Hospital General Dr. Manuel Gea González. Ciudad de México, México

Resumen

La esporotricosis es una micosis subcutánea frecuente en América Latina cuyos agentes causales son hongos dimórficos pertenecientes al complejo de especies crípticas *Sporothrix schenckii*. La infección se adquiere por la inoculación traumática de material orgánico contaminado. La respuesta inmune del huésped incluye la quimiotaxis de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y la liberación de sus componentes granulares. La LF es una proteína perteneciente a la familia de las transferrinas que se encuentra presente dentro de las estructuras granulares. Se considera que afecta al crecimiento y desarrollo de agentes infecciosos, incluyendo bacterias y hongos. La expresión de LF en la esporotricosis no ha sido reportada previamente. **Objetivo:** Determinar la expresión de LF usando la técnica de inmunohistoquímica en la esporotricosis humana. **Material y métodos:** Se realizó una búsqueda en los archivos del Servicio de Dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González durante un periodo de cinco años; se seleccionaron los casos con diagnóstico de esporotricosis confirmado por biopsia y/o cultivo positivo. **Resultados:** Se identificaron seis casos, de los cuales sólo tres contaban con material biológico suficiente. En todos los casos se detectó la presencia de LF alrededor de las estructuras fúngicas.

PALABRAS CLAVE: Inmunidad innata. Lactoferrina. *Sporothrix schenckii*.

Abstract

Sporotrichosis is a common subcutaneous mycosis in Latin America, produced by dimorphic fungi belong to *Sporothrix schenckii* complex of cryptic species. Infection is acquired by traumatic inoculation with contaminated organic material. Host immune response includes polymorphonuclear neutrophils chemotaxis and release of granular components. Lactoferrin is a protein member of the transferrin family of iron-binding proteins, present inside polymorphonuclear granular structure, and has been reported to affect growth and development of infectious agents, including fungal organisms. Nevertheless, lactoferrin expression in sporotrichosis infections has not been reported yet. **Objective:** To determine the expression of lactoferrin using immunohistochemical staining in sporotrichosis human infection. **Material and methods:** The dermatology department's files during a period of five years were reviewed; cases with a diagnosis of sporotrichosis were selected and lactoferrin

Correspondencia:

*Lucía Rangel-Gamboa

Departamento de Ecología de Agentes Patógenos
Hospital General Dr. Manuel Gea González
Av. Calzada de Tlalpan, 4800
Col. Sección XVI, Del. Tlalpan
C.P. 14080, Ciudad de México, México
E-mail: draluciarangel@yahoo.com.mx

Fecha de recepción: 15-07-2015

Fecha de aceptación: 02-08-2015

immunostaining was performed when enough biological material was available. **Results:** Three cases with a diagnosis of sporotrichosis and adequate biological material on paraffin block were identified. In all cases, lactoferrin immunostaining was positive around yeast cell. (Gac Med Mex. 2016;152:831-5)

Corresponding author: Lucía Rangel-Gamboa, raluciarangel@yahoo.com.mx

KEY WORDS: Innate immunity. Lactoferrin. *Sporothrix schenckii*.

Introducción

La esporotricosis es una micosis subcutánea frecuente en México y con una alta prevalencia en Latinoamérica¹⁻⁴ que se adquiere por la inoculación traumática de material orgánico contaminado⁵. La respuesta inmune del huésped incluye la quimiotaxis de PMN y la subsecuente liberación de sus componentes granulares⁶. La respuesta inmune innata es crucial en el control del crecimiento del patógeno y la activación subsecuente de la inmunidad adaptativa⁷. La primera línea de defensa de la inmunidad innata la constituyen las barreras naturales que separan el organismo del medio ambiente (piel y mucosas); en estos tejidos se producen sustancias antimicrobianas⁸. Una vez se introduce el hongo en el hospedero, enfrenta una serie de mecanismos de defensa que incluyen el reconocimiento por parte de los receptores celulares, la interacción con péptidos antimicrobianos (PAM) y la fagocitosis, entre otros⁹. En la actualidad, se considera que los PAM poseen propiedades antimicrobianas directas; además, activan y coordinan múltiples componentes de la respuesta innata y adaptativa. Entre los PAM mejor caracterizados se encuentran las β-defensinas, las catelicidinas, la LF, la lisoína, las perforinas, etc.¹⁰.

La LF se considera un PAM importante que participa en la respuesta inmune contra virus, bacterias y hongos¹¹⁻¹³. Es una proteína transportadora de hierro que no posee grupo hemo, es miembro de la familia de las transferrinas¹⁴ y se caracteriza por su gran afinidad al hierro, incluso en pH muy ácido. Si bien se ha identificado la presencia de LF en la respuesta inmune contra *Candida albicans*, no se ha reportado en otros hongos. El objetivo de este trabajo fue identificar la expresión de LF en cortes histológicos obtenidos de pacientes con esporotricosis.

Material y método

El presente trabajo fue aprobado por los comités de ética de las instituciones participantes y se realizó

cumpliendo lo estipulado en la declaración de Helsinki. Se revisaron los expedientes del Servicio de Dermatopatología de un periodo de cinco años (2003-2008). Se incluyeron los casos con diagnóstico de esporotricosis confirmado por estudio histológico y/o cultivo (Fig. 1). En todos los casos se descartaron otras infecciones cutáneas como causa de las lesiones clínicas. Se excluyeron tres casos que no contaban con suficiente material biológico. Los cortes histológicos fueron revisados de manera independiente por dos observadores. A continuación se describe la técnica para realizar las tinciones:

- Tinción con hematoxilina-eosina.

Se utilizó hematoxilina de Harris durante 1 min para teñir el tejido; posteriormente se lavó con agua. Para diferenciar se utilizó alcohol ácido, se lavó y seguidamente se aplicó agua amoniacal para virar; se lavó y tiñó nuevamente con eosina por 30 s; se deshidrató y se montó.

- Técnica para la detección de LF por inmunohistoquímica.

Para la detección de la LF se utilizó el *Cell and tissue staining kit goat kit HRP-AEC System* (catálogo núm. CTS009) de R&D Systems; el anticuerpo primario fue la inmunoglobulina G polyclonal anti-LF humana, elaborada en cabra, a una concentración de 200 µg/ml, de los laboratorios Santa Cruz Biotechnology.

Resultados

Los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina confirmaron los reportes previos encontrados en los expedientes clínicos y mostraron imágenes compatibles con esporotricosis, que se caracterizan por un infiltrado inflamatorio granulomatoso crónico, compuesto por histiocitos epiteloides, con o sin presencia de células gigantes multinucleadas; en el centro del granuloma se observaron colecciones de neutrófilos^{15,16}. Sólo en el caso 3 se evidenciaron cuerpos asteroideos. La tinción con LF en un caso facilitó y en los otros mejoró la visualización de las levaduras (Fig. 2). Concomitantemente, utilizando la detección con inmunofluorescencia, se encontró la presencia en el infiltrado



Figura 1. Imagen clínica: esporotricosis linfocutánea.

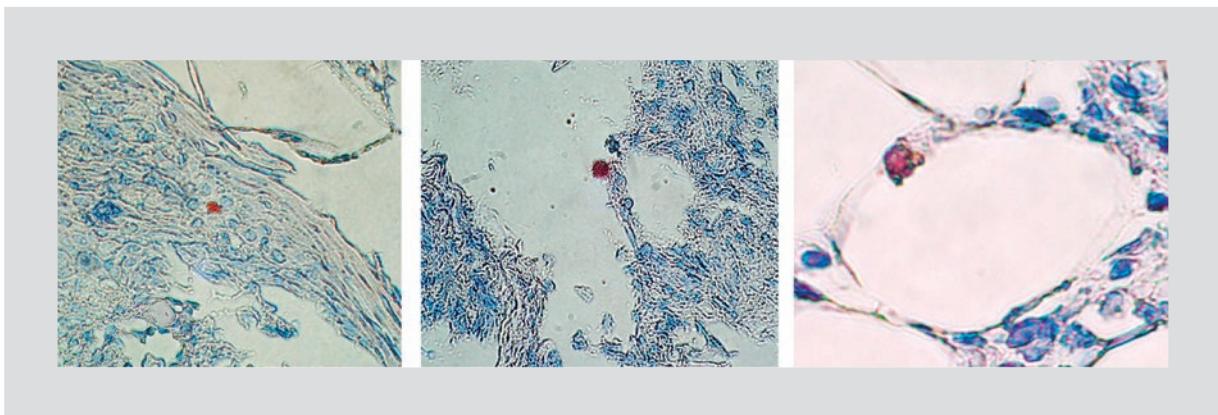


Figura 2. Tinción de inmunohistoquímica para LF en epidermis, dermis y tejido celular subcutáneo (cada foto corresponde a un paciente diferente).

inflamatorio de linfocitos de tipo CD4+ en la epidermis, alrededor de las estructuras vasculares dérmicas y en el tejido celular subcutáneo (Fig. 3).

Discusión

La LF forma parte de la respuesta inmune innata y constituye un puente entre ésta y la respuesta adaptativa. Entre los mecanismos de acción reportados contra las bacterias se encuentran la permeabilización de la membrana, el secuestro del ion Fe³⁺, la inhibición

del crecimiento bacteriano y de la expresión de factores de virulencia^{17,18}. La función bactericida de la LF se atribuye a su asociación directa sobre la superficie bacteriana. En bacterias gramnegativas su unión al lipopolisacárido daña la membrana externa¹⁹; en otras bacterias previene la adhesión a las células del huésped. Su acción en los hongos se reportó para *Candida* spp. Se describieron dos mecanismos antifúngicos: el secuestro del ion Fe³⁺ y los cambios en la permeabilidad de la membrana, de forma similar a lo que ocurre en las bacterias²⁰⁻²². Las acciones sobre la membrana

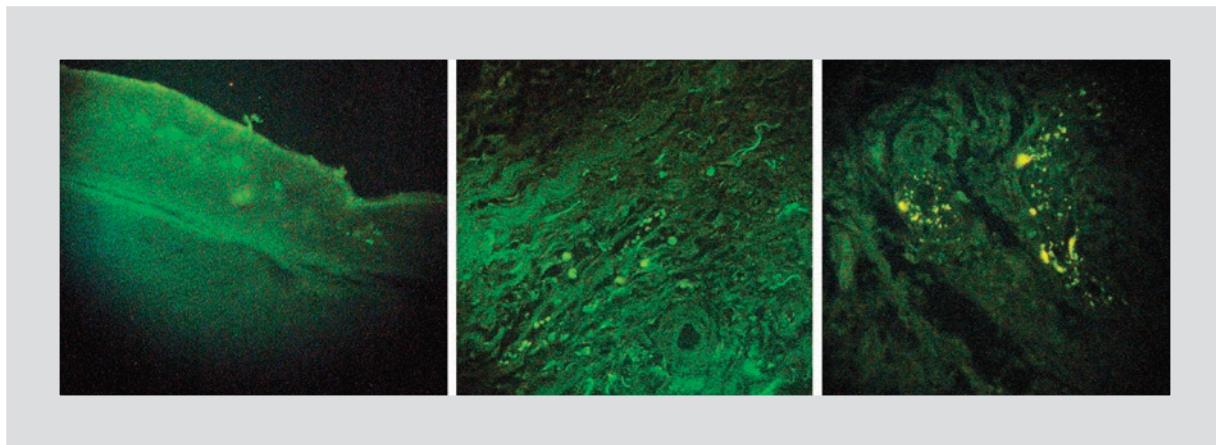


Figura 3. Linfocitos CD4 presentes en epidermis, dermis y perivasculares.

celular se observaron tanto con LF bovina como con LF humana y con péptidos derivados de éstas. Por ejemplo, utilizando un péptido constituido por los ocho primeros residuos del extremo N-terminal de LF bovina, se observó la unión al lípido A, presente en la membrana citoplasmática de una cepa multirresistente de *Candida* sp, lo que indujo la permeabilización de la membrana fúngica²³. Otro efecto reportado fue la diferenciación de monocitos a macrófagos, acompañada de un aumento en el reconocimiento de patógenos²⁴. Por otra parte, en condiciones experimentales, se asoció la acción de la LF con la activación de una respuesta inmune polarizada de tipo Th-1²⁵. Se considera que la LF favorece la maduración de las células dendríticas y la activación de las células T. La administración oral de LF aumenta la producción de interleucina 8, interleucina 10 e interferón γ en los linfocitos del epitelio intestinal y en los nódulos linfáticos mesentéricos; así mismo, aumenta el número de linfocitos CD4 y CD8 y de células *natural killer*. En el intestino delgado aumenta la expresión de NOD-2 (*nucleotide-Binding oligomerization, domain containing-2*), interferón β e interleucina 12p40²⁶. Desde el punto de vista clínico, los beneficios reportados de la administración oral de LF incluyen una mejoría en la microflora intestinal, un aumento de la feritina sérica y el hematocrito, y una disminución de la presentación de enfermedades del tracto respiratorio bajo. En lo referente a las infecciones cutáneas, en modelos animales, la administración de LF ha demostrado efectos benéficos en el herpes virus y la candidiasis oral²⁷, mientras que en humanos un estudio doble ciego demostró un efecto benéfico en *tinea pedis*.

En los casos de esporotricosis reportados en el presente trabajo se encontró la presencia de LF en la

superficie de las levaduras de *S. schenckii* y de linfocitos CD4+ en la reacción granulomatosa presente en los tejidos circundantes, de forma similar a lo reportado para otros microorganismos²⁸. Ello sugiere que la LF se une a la pared fúngica. Sin embargo, la composición de la pared en *S. schenckii* difiere de *Candida* sp²⁹, por lo que probablemente en este caso actúe más como un marcador de quimiotaxis y/o inductor de la diferenciación de monocitos a macrófagos que como un fungicida directo.

En la actualidad, se encuentran en desarrollo diversos PAM derivados de la LF que presentan una actividad variable contra *C. albicans* y en modelos *in vitro* de membranas fúngicas. Algunos péptidos derivados de la LF pueden alterar la distribución de las partículas dentro de la membrana afectando a su morfología y facilitando su destrucción³⁰⁻³². Los análisis de eficacia y toxicidad de la LF y/o sus derivados peptídicos, en las diversas modalidades de administración (cutánea o sistémica), parecen prometedores para la generación de nuevos fármacos antifúngicos.

Conclusión

La LF está presente y adherida en las levaduras de *S. schenckii*, lo que sugiere su acción fungistática y su participación en la respuesta inmune innata en la esporotricosis.

Bibliografía

1. Campos P, Arenas R, Coronado H. Epidemic cutaneous sporotrichosis. Int J Dermatol. 1994;33(1):38-41.
2. Coti IA. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. Mycopathologia. 1989;108(2):113-6.

3. Bada-del-Moral M, Arenas R, Ruiz J. Esporotricosis en Veracruz. Estudio de cinco casos. *Dermatol Rev Mex.* 2007;51:9-13.
4. Oliveira M, Almeida R, Muniz M, Gutierrez M, Zancope R. Phenotypic and Molecular Identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia.* 2011;172(4):257-67.
5. Nicot J, Mariat F. [Morphological characteristics and systematic position of *Sporothrix schenckii*, the causative agent of human sporotrichosis]. *Mycopathol Mycol Appl.* 1973;49(1):53-65.
6. Traynor TR, Huffnagle GB. Role of chemokines in fungal infections. *Med Mycol.* 2001;39(1):41-50.
7. Loures FV, Pina A, Felonato M, Araújo EF, Leite KR, Calich VL. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. *Infect Immun.* 2010;78(3):1078-88.
8. Traynor TR, Huffnagle GB. Role of chemokines in fungal infections. *Med Mycol.* 2001;39(1):41-50.
9. Blanco JL, Garcia ME. Immune response to fungal infections. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;125(1-2):47-70.
10. Schauber J, Gallo RL. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(2):261-6.
11. Schaire UE, Collins HL, Priem F, Kaufmann SH. Correction of iron overload defect in β -2microglobulin knockout mice by lactoferrina abolishes their susceptibility to tuberculosis. *J Exp Med.* 2002;196(11):1507-13.
12. Rodriguez-Franco DA, Vazquez-Moreno L, Ramos-Clamont G. [Antimicrobial mechanisms and potential clinical application of lactoferrin]. *Rev Latinoam Microbiol.* 2005;47(3-4):102-11.
13. Drago-Serrano M. Actividades antibacterianas de la lactoferrina. *Enf Inf Microbiol.* 2006;26:58-63.
14. Gonzalez-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;33(4):301.e1-8.
15. Barhill R, Crowson N. Dermatopathology. 2.^a ed. McGraw-Hill; 2004. p. 496.
16. Lurie HI. Histopathology of sporotrichosis. Notes on the nature of the asteroid body. *Arch Pathol.* 1963;75:421-37.
17. Parrow NL, Fleming RE, Minnick MF. Sequestration and Scavenging of Iron in Infection. *Infect Immun.* 2013;81(10):3503-14.
18. Skar EP. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathogens.* 2010;6(8):e1000949.
19. Drago-Serrano ME, Garza-Amaya M, Serrano-Luna JS, Campos-Rodríguez R. Lactoferrin-lipopolysaccharide (LPS) binding as key to antibacterial and antiendotoxic effects. *Int Immunopharmacol.* 2012;12(1):1-9.
20. Kirkpatrick CH, Green I, Rich RR, Schade Al. Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron-unsaturated lactoferrina: relation to host-defense mechanisms in chronic mucocutaneous candidiasis. *J Infect Dis.* 1971;124(6):539-44.
21. Bellamy W, Wakabayashi H, Takase M, Kawase K, Shimamura S, Tomita M. Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrina. *Med Microbiol Immunol.* 1993;182(2):97-105.
22. Samaranayake YH, Samaranayake LP, Wu PC, So M. The antifungal effect of lactoferrina and lysozyme on *Candida krusei* and *Candida albicans* APMIS. 1997;105(11):875-83.
23. Mishra B, Leishangthem GD, Gill K, et al. A novel antimicrobial peptide derived from modified N-terminal domain of bovine lactoferrina: Design, synthesis, activity against multidrug-resistant bacteria and *Candida*. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1828(2):677-86.
24. Van der Does AM, Bogaards SJ, Ravensbergen B, Beekhuizen H, van Dissel JT, Nibbering PH. Antimicrobial peptide hLF1-11 directs granulocyte-macrophage colony-stimulating factor- driven monocyte differentiation toward macrophages with enhanced recognition and clearance of pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(2):811-6.
25. Spadaro M, Caorsi C, Ceruti P, et al. Lactoferrin, a major defense protein of innate immunity, is a novel maturation factor for human dendritic cells. *FASEB J.* 2008;22(8):2747-57.
26. Tomita M, Wakabayashi H, Shin K, Yamauchi K, Yaeshima T, Iwatsuki K. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie.* 2009;91(1):52-7.
27. Takakura N, Wakabayashi H, Ishibashi H, et al. Effect of orally administered bovine lactoferrina on the immune response in the oral candidiasis murine model. *J Med Microbiol.* 2004;53(Pt 6):495-500.
28. Palma A, Castrillon L, Espinosa V, Becerril D, Padilla M, Arenas-Guzman R. Existencia de lactoferrina en granos de micetoma: estudio de ocho actinomicetomas humanos. *Dermatol Rev Mex.* 2014;58:142-9.
29. Martínez-Alvarez JA, Pérez-García LA, Flores-Carreón A, Mora-Montes HM. The immune response against *Candida* spp. and *Sporothrix schenckii*. *Rev Iberoam Microl.* 2014;31(1):62-6.
30. Boltscher J, Nazmi K, van Marle J, van't Hof W, Veerman E. Chimerization of lactoferricin and lactoferrampin peptides strongly potentiates the killing activity against *Candida albicans*. *Biochem Cell Biol.* 2012;90(3):378-88.
31. Silva T, Adão R, Nazmi K, et al. Structural diversity and mode of action on lipid membranes of three lactoferricandidacial peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1828(11):1329-39.
32. Viejo-Díaz M, Andrés MT, Fierro JF. Different anti-*Candida* activities of two human Lactoferrin-derived peptides, Lfpep and kaliocin-1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(7):2583-8.