



11212  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO 39

Facultad de Medicina

División de Estudios de Posgrado

Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

DETERMINACION DE LA EXPRESION DE LA DEFENSINA HUMANA BETA 2 EN EL PIE DE ATLETA MEDIANTE LA TECNICA DE RETROTRANSCRIPCION Y REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

TESIS

Que para obtener el título de:

ESPECIALIDAD EN DERMATOLOGIA

Presenta:

DRA. MARCELA SAEB LIMA

Asesor: Dr. Roberto Arenas Guzmán



México, D. F. 2000

270324



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Medicina**

**División de Estudios de Posgrado**

**Hospital General "Dr. Manuel Gea González"**

**Determinación de la expresión de la defensina humana beta 2 en el pie  
de atleta mediante la técnica de retrotranscripción y reacción en cadena  
de la polimerasa**

**TESIS**

**Que para obtener el título de  
Especialidad en Dermatología**

**Presenta**

**Dra. Marcela Saeb Lima**

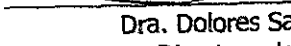
**Asesor: Dr. Roberto Arenas Guzmán**

**México, D.F. 2000**


HOSPITAL GENERAL  
 "DR. MANUEL GEA GONZALEZ"  
 DIRECCION DE ENSEÑANZA


  
 Dr. Héctor Villarreal Velarde  
 Director de Enseñanza

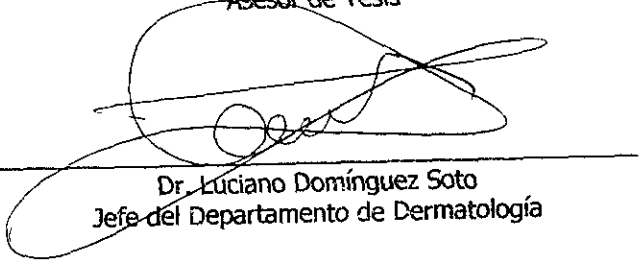
HOSPITAL GENERAL  
 DR. MANUEL GEA GONZALEZ  
 DIRECCION DE INVESTIGACION

  
 Dra. Dolores Saavedra Cordero  
 Directora de Investigación

HOSPITAL GENERAL  
 "DR. MANUEL GEA GONZALEZ"  
 SUBDIRECCION DE INVESTIGACION

  
 Dr. Luis Villanueva  
 Subdirector de Investigación

  
 Dr. Roberto Arenas Guzmán  
 Asesor de Tesis

  
 Dr. Luciano Domínguez Soto  
 Jefe del Departamento de Dermatología

### Agradecimientos:

Es a través de estas líneas que agradezco a todas aquellas personas que colaboraron en el desarrollo de este proyecto de investigación:

A Héctor Sobrino, mi pareja de vida que guía mis emociones y mis pensamientos

A mis padres, que siempre apoyan todos mis proyectos

A mis hermanos, que creen en mí

Al Dr. Gustavo Reyes Terán por haberme impulsado y por haber confiado en esta idea, haciéndola realidad

Al Dr. Luis Manuel Terán quien me alentó para seguir adelante

A Gabriel, Gisela y Anita quienes crearon conmigo un equipo

Al Dr. Arenas por su pensamiento sensato

Al Dr. Luis Villanueva quien decoró este proyecto con su entusiasmo y su pensamiento científico

A la industria Farmacéutica Janssen-Cilag, que apoyó económicamente este proyecto a través del Ingeniero José Mora

<b>Antecedentes</b>	<b>4</b>
<b>I. Inmunidad innata</b>	<b>4</b>
<b>II. Péptidos antimicrobianos</b>	<b>4</b>
A. Estructura y síntesis	5
<b>III. Defensinas</b>	<b>6</b>
A. Estructura	6
B. Síntesis	6
C. Función	7
D. Expresión de las defensinas en la piel	7
<b>IV. Descripción del pie de atleta</b>	<b>8</b>
A. Agentes causales	9
B. Patogénesis	10
<b>Planteamiento del problema</b>	<b>12</b>
<b>Justificación</b>	<b>12</b>
<b>Objetivos primarios</b>	<b>12</b>
<b>Objetivos secundarios</b>	<b>12</b>
<b>Diseño</b>	<b>13</b>
Diseño del estudio	13
<b>Material y métodos</b>	<b>13</b>
Población de estudio	13
Tamaño de la muestra	13
Criterios de inclusión	13
Criterios de exclusión	13
Consideraciones éticas	14
Variables	14
Parámetros de medición	14
<b>Recursos</b>	<b>14</b>
Recursos humanos	14
Recursos materiales	15
<b>Técnicas</b>	<b>16</b>
Obtención de las muestras microbiológicas	16
Obtención de las biopsias	16
Transporte y almacenamiento	17
Extracción de RNA de tejido	17
Técnica de RT-PCR	18
Técnica de PCR	18
Electroforesis	18

<b>Resultados</b>	19
<u>Pacientes</u>	19
<u>Diagnósticos</u>	20
<u>Examen directo</u>	20
<u>Cultivo</u>	20
<u>Extracción del RNA de las muestras de casos y controles</u>	21
<u>Expresión de la defensina humana beta 2</u>	22
<b>Discusión</b>	23
<b>Conclusión</b>	25
<b>Anexo 1</b> Hoja de captura de datos	26
<b>Anexo 2</b> Carta de consentimiento informado	27
<b>Referencias</b>	28

## Antecedentes

### **I. Inmunidad innata**

Todos los organismos multicelulares comparten la función de barrera en contra de las agresiones físicas y microbiológicas del medio ambiente. Dicha función se cumple al regular la colonización del epitelio intacto mediante un sistema de defensa que responde con el aumento de la actividad antimicrobiana cuando existe ruptura de la integridad epitelial.

La actividad antimicrobiana epitelial se mantiene a través de la inmunidad innata, la cual incluye todas las herramientas codificadas en el huésped a partir de las primeras líneas celulares, como respuesta a la infección o a la inflamación. La inmunidad innata no requiere del proceso de iniciación seguido de la estimulación antigénica de linfocitos específicos, por el contrario se ha demostrado que los elementos de esta inmunidad pueden regular la respuesta inmune adaptativa mediante la identificación de proteínas microbianas como antígenos extraños, y mediante la activación de las células T nativas.<sup>1</sup>

Los componentes de la inmunidad innata se expresan constitutivamente o pueden inducirse por diversos estímulos. Dentro de éstos se incluyen:

1. Las moléculas inorgánicas (óxido nítrico, peróxido de hidrógeno, ácido clorhídrico).
2. Moléculas orgánicas simples (ácidos grasos).
3. Péptidos antimicrobianos (cecropinas, magaininas, defensinas, catelicidinas).
4. Proteínas antimicrobianas (proteína de incremento de la permeabilidad y bactericida, fosfolipasa A2, lisozimas, complemento).
5. Proteínas de unión (proteína de unión de manosa, colectinas).
6. Secreción de inmunoglobulinas.
7. Las células junto con sus moléculas de señales (macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales).<sup>2</sup>

### **II. Péptidos antimicrobianos**

Se han identificado en la actualidad cientos de péptidos antimicrobianos en casi todos los seres vivos, incluyendo mamíferos, anfibios, insectos y plantas.<sup>3</sup> Los primeros péptidos antimicrobianos, denominados tioninas, fueron aislados a partir de las plantas en la década de 1970, los cuales al ser inyectados en animales produjeron efectos tóxicos que no se observaron en dichas plantas. Se consideraron inicialmente como productos naturales y no como parte de la función inmunitaria.<sup>4</sup>

Los primeros péptidos antimicrobianos relacionados a la inmunidad inducida por bacterias, fueron aislados de los insectos en la década de 1980, y se les dió el nombre de cecropinas. Estos péptidos catiónicos de 37 aminoácidos, se sintetizaron y purificaron de la hemolinfa, posterior a la inyección de bacterias en las larvas de los gusanos de seda (Cecropia). Las cecropinas demostraron actividad antimicrobiana en contra de bacterias



gram negativas incluyendo *E. coli*, *B. subtilis*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*.<sup>5</sup> También se han aislado de las moscas (*Drosophila*) y del intestino delgado porcino.<sup>6,7</sup>

Posteriormente, a la mitad de la década de los 1980 se identificaron las estructuras de abundantes clases de péptidos almacenados en los gránulos de los granulocitos en humanos y conejos. Estos péptidos catiónicos que incluyen en su estructura seis cisteínas, se denominaron defensinas, y están constituidos por 29 a 41 aminoácidos con 3 puentes disulfuro. Son bactericidas en contra de bacterias gram positivas y negativas, e inactivas en contra de *Cryptococcus neoformans* y virus herpes simple tipo 1.<sup>8,9</sup>

A finales de la década de 1980, Michael Zasloff identificó en la piel de las ranas *Xenopus laevis*, péptidos antimicrobianos catiónicos, a las que denominó magaininas (del hebreo que significa escudo).<sup>10</sup> Estos péptidos están constituidos por 23 a 27 aminoácidos, que se caracterizan por tener una estructura alfa helicoidal anfipática cuando el medio es hidrofóbico, lo que permite insertarse en las membranas de las bacterias y formar canales de iones dependientes de voltaje, produciendo una alteración de la permeabilidad y la subsecuente lisis celular.<sup>3,11</sup>

## A. Estructura y síntesis

Existen a la fecha siete clases de péptidos antimicrobianos catiónicos anfipáticos: lineales con una hélice alfa, lineal enriquecido en aminoácidos selectos, en forma de asa con un solo puente disulfuro, conformación de hoja beta con múltiples puentes disulfuro, fragmentos peptídicos, y proteínas grandes.<sup>2</sup>

Los péptidos catiónicos se caracterizan por tener una carga neta positiva, por lo menos de +2, y usualmente de +4, +5 ó +6, dependiendo del número de aminoácidos arginina y lisina que posean en su estructura. Se encuentran conformados en tres dimensiones, son anfipáticos, y presentan una cara hidrofóbica y una hidrofílica. La cara hidrofóbica está compuesta por cadenas de aminoácidos no polares, y la hidrofílica por los residuos polares cargados positivamente.<sup>12</sup>

Se han identificado algunas células de los mamíferos y el epitelio de diferentes tejidos como sitios de producción de péptidos antimicrobianos. Por ejemplo en los neutrófilos estos péptidos constituyen del 10 al 18% de las proteínas totales, colaborando en su función de defensa inmediata en contra de los microorganismos y en las reacciones inflamatorias agudas. También se encuentran en grandes concentraciones en la superficie de la mucosa (lengua, tráquea e intestino) que ha sufrido algún daño.<sup>13</sup>

Los péptidos antimicrobianos catiónicos se codifican en el genoma como prepropéptidos, con una clásica señal N-terminal para el almacenamiento intracelular o la liberación extracelular.<sup>14</sup> Durante el transporte intracelular se mantienen como propéptidos, para evitar el efecto tóxico en los organelos, por medio del segmento *pro* que neutraliza al péptido catiónico, y que es el responsable del desplazamiento intracelular.<sup>15</sup> Uno o más propéptidos son codificados en un solo producto de transcripción, y mediante un proceso que incluye varios pasos se libera el péptido biológicamente activo. El almacenamiento de los péptidos se lleva a cabo en los gránulos intracelulares, como se ha observado en los granulocitos de los mamíferos<sup>16,17</sup> ó en elementos glandulares como en la piel de las ranas *Xenopus* y en el tubo digestivo.<sup>10,18</sup> El péptido almacenado puede estar en su forma de molécula activa, la cual se encuentra neutralizada por los componentes aniónicos en la membrana basal de los gránulos ó fusionado en los fagosomas que contienen gránulos de propéptidos y gránulos de elastasa, ésta última

rompe el propéptido para liberar el agente antimicrobiano totalmente funcional.<sup>19</sup> Los péptidos almacenados en los gránulos intracelulares funcionan a través de la fusión de los gránulos con fagosomas que contienen a los organismos fagocitados. Alternativamente los neutrófilos y los macrófagos, que son atraídos a los sitios de infección o de inflamación, fusionan la membrana de los gránulos con la membrana celular, y liberan a los péptidos antimicrobianos localmente.

Algunos péptidos antimicrobianos comparten para su síntesis una vía común en la expresión inducible. Esto significa que posterior a la exposición de bacterias vivas, bacterias atenuadas ó simplemente una alteración en la barrera epitelial se estimula la síntesis de estos péptidos.<sup>20</sup> La inducción requiere tanto de la síntesis del RNA como de la proteína, que se detecta en unas cuantas horas, presentando un pico en su concentración entre 16 horas y algunos días. En las células epiteliales de la tráquea se ha demostrado la inducción de la síntesis de las defensinas- $\beta$  posterior a la unión de la lipopolisacáridasa bacteriana a la proteína CD-14 de la membrana celular con la subsecuente activación del regulador de transcripción NF- $\kappa$ B.<sup>21</sup>

Los sitios de síntesis de los péptidos antimicrobianos incluyen a células derivadas de la médula ósea, como granulocitos y macrófagos; células epiteliales especializadas (glándulas dérmicas de las ranas, células de Paneth del intestino delgado, plexo coroide, epitelio de la vagina, epitelio del tubo genitourinario), epitelio ciliado de la vía aérea, y más recientemente identificados los queratinocitos.<sup>22-25</sup>

### **III. Defensinas**

#### **A. Estructura**

Las defensinas se incluyen dentro del grupo de los péptidos antimicrobianos catiónicos. Su conformación es de una hoja beta, con seis cisteínas y tres puentes disulfuro. Están enriquecidos con residuos de arginina y lisina, lo que les da una carga positiva a pH neutro. Son solubles en agua o en una solución salina y son resistentes a la desnaturalización por calor. Son activas en concentraciones bajas de sal e inactivas a concentraciones altas de ésta. Existen dos grupos, las defensinas- $\alpha$  y defensinas- $\beta$ , siendo estas últimas de mayor tamaño. La principal diferencia entre ambas radica en los puentes disulfuro. La alineación de las cisteínas se conserva en cada grupo y solo se requiere de escasas deleciones para alinear a la familia entera. En las defensinas- $\alpha$  las seis cisteínas están unidas con puentes disulfuro en las posiciones 1-6, 2-4 y 3-5, mientras que en las defensinas- $\beta$  se encuentran en las posiciones 1-5, 2-4 y 3-6. Estas dos formas de puentes cruzados dan como resultado estructuras idénticas de tres cadenas de hoja beta antiparalelas.<sup>26</sup>

#### **B. Síntesis**

Las defensinas se producen como preproteínas de 95 residuos de longitud. La porción "pro" es ácida y neutraliza a la defensiva madura que es básica, inhibiendo tanto la actividad antimicrobiana como la capacidad citotóxica sobre las líneas celulares humanas K562.<sup>27</sup> La primera defensiva- $\beta$  descubierta fue el péptido antimicrobiano de la tráquea de los bovinos (TAP), seguido de una gran cantidad de defensinas- $\beta$  en los

neutrófilos de los bovinos, y el péptido antimicrobiano lingual. Todos estos se sintetizan en respuesta a reacciones inflamatorias.<sup>28</sup>

Estudios genéticos han identificado que ambas defensinas se localizan en el cromosoma 8p23.1-p23.2 de ratones y humanos. Las defensinas humanas probablemente han evolucionado a través de varias duplicaciones de genes colocando a las defensinas- $\alpha$  y defensinas- $\beta$  en sitios adyacentes en el mapa genético.<sup>29-30</sup>

Generalmente las defensinas- $\alpha$  se almacenan en los gránulos intracelulares, mientras que las defensinas- $\beta$  son sintetizadas en forma primaria por las células epiteliales. En estas últimas se puede inducir su expresión ó pueden estar en forma constitutiva para posteriormente ser excretadas hacia el moco de la superficie de las vías aéreas, hacia el lumen del tubo digestivo (a partir de las células de Paneth) ó en la piel.

La síntesis de las defensinas- $\beta$  se inicia con la interacción de un lipopolisacárido con el receptor CD-14, produciendo una señal de transducción que fosforila a I $\kappa$ B, el cual es degradado por la vía de la ubiquitin-proteasoma. Una vez liberado del inhibidor, NF $\kappa$ B se transloca en el núcleo donde reconoce y se une en dirección hacia arriba a la secuencia GGGRNYYCC3'. Dicha secuencia de DNA se ha identificado en los genes de las defensinas- $\beta$  (péptidos antimicrobianos de inducción) tanto en humanos como en insectos, pero parecen estar ausentes en los genes de las defensinas- $\alpha$  almacenadas en los gránulos.<sup>20-21,26</sup>

### **C. Función**

Para que se lleve a cabo la actividad antimicrobiana de las defensinas y de otros péptidos antimicrobianos catiónicos se requiere de la interacción del péptido catiónico con los componentes aniónicos de las membranas lipídicas de las bacterias, virus, hongos ó protozoarios. Esta atracción electrostática inicial da como resultado la inserción ó penetración del péptido en la membrana. Los péptidos con mayor carga positiva son 5 a 10 veces más activos en contra de las bacterias. Las propiedades bactericidas de los péptidos anfipáticos, alfa-helicoidales (cecropinas, magaininas), y con puentes disulfuro (defensinas) se relacionan con su habilidad de ensamblaje en la membrana del microorganismo para formar poros, que éste no es capaz de compensar por lo que el gradiente de energía y de iones intracelulares se disipa. La muerte por lisis celular ocurre en unos cuantos minutos, y depende de la concentración del péptido antimicrobiano.<sup>2,13</sup>

La importancia fisiológica de las defensinas humanas  $\beta$  (hBD) se ilustra en los estudios realizados en fibrosis quística. En esta enfermedad hereditaria existe una mutación del gen que codifica para un canal iónico en las vías aéreas. Como resultado de esta alteración, se aumenta la concentración de iones en el moco del epitelio hasta un nivel en el que se inactiva las hBD, y por lo tanto se vuelve susceptible a infecciones por *P. aeruginosa*.<sup>31</sup>

### **D. Expresión de las defensinas en la piel**

Harder y cols<sup>25</sup> aislaron y purificaron péptidos antimicrobianos de la escama de pacientes con psoriasis. Dedujeron la secuencia de aminoácidos del péptido precursor, que consistía en 41 residuos que estaban presentes tanto en el péptido maduro como en la secuencia líder; esto sugirió que se trataba de un péptido secretado. La homología más cercana fue con los péptidos antimicrobianos derivados de la tráquea y la lengua de los

bovinos, los cuales se producen en el epitelio de éstos en respuesta a citocinas inflamatorias o al contacto con microorganismos. Denominaron a este péptido como defensina humana $\beta$ 2(hBD-2), la cual fue la segunda defensina identificada; la primera (defensina humana $\beta$ 1- hBD-1-) fue descubierta en el ultrafiltrado sanguíneo humano; se produce principalmente por el epitelio del tubo genitourinario, y en menor grado de la tráquea y las vías aéreas. Encontraron que la hBD-2 presentaba gran actividad bactericida en contra de bacterias gram negativas (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) con una dosis letal<sub>50</sub> cerca de los 10 $\mu$ g/ml<sup>-1</sup>; así como en contra de la levadura *Candida albicans* (dosis letal<sub>50</sub> de 25 $\mu$ l/ml<sup>-1</sup>). Pero sólo encontraron un efecto bacteriostático en contra de *Staphylococcus aureus*, con una concentración tan alta como 100 $\mu$ g/ml<sup>-1</sup>. Mediante la determinación semicuantitativa con retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) observaron una baja expresión del RNA mensajero (RNAm) de la hBD-2 en los queratinocitos derivados de la piel, pero al ser estimulados con el factor de necrosis tumoral alfa, se observó aumento en la expresión de la hBD-2. Este incremento también se corroboró al estimular a los queratinocitos con bacterias gram positivas y negativas, así como *C. albicans*.

Mediante la técnica de RT-PCR e hibridación *in situ*, Falconer A y cols<sup>32</sup> identificaron la expresión de la hBD-1 y la hBD-2 en 23 muestras de piel normal. Se detectó el RNAm de hBD-1 en 21 de 23 muestras, y solo en 13 de 23 muestras para hBD-2, y en tres de éstas la expresión fue débil. Con hibridación *in situ* se demostró la expresión suprabasal de hBD-1, así como inicialmente la identificaron Fulton C y cols<sup>33</sup>, en los queratinocitos suprabasales y en los conductos de las glándulas sudoríparas en la dermis. Por otro lado Milner SM y cols<sup>34</sup> encontraron, mediante la técnica de RT-PCR, solamente la expresión de hBD1 en la piel de ocho pacientes que habían sufrido quemaduras de espesor completo.

#### IV. Descripción del pie de atleta<sup>35</sup>

Las micosis superficiales permanecen como un problema de salud continuo. Estas infecciones se producen principalmente por levaduras como *Candida albicans*, especies de *Malassezia* ó por dermatofitos.

Las dermatofitosis afectan la piel y los anexos. Son micosis cosmopolitas que predominan en zonas tropicales. En México se observa entre los diez primeros lugares de la consulta dermatológica. Afecta a individuos de cualquier edad, raza o sexo, así como de cualquier medio socioeconómico u ocupación. Según su localización se manifiestan por afección pilar, engrosamiento ungueal, ó por placas con eritema y descamación con bordes activos. Son de evolución crónica, que puede ó no ser pruriginosa. Clínicamente se clasifican en formas superficiales que incluyen la tiña de la cabeza, tiña del cuerpo, tiña imbricada, tiña inguinal, tiña de la mano, tiña de los pies, tiña de las uñas; y las formas profundas incluyen a las dermatofitosis inflamatorias, querion de Celso, favus, tiña de la barba, granuloma tricoftico, micetoma y enfermedad dermatofítica.

La incubación en las dermatofitosis dura de días a semanas, en promedio siete a 15 días, las manifestaciones clínicas dependen de la localización y del agente causal.

El pie de atleta se ha utilizado para referirse a los padecimientos del pie ocasionados por dermatofitos como la tiña de los pies, pero también para las manifestaciones causadas por hongos como *Candida* y *Trichosporon*.<sup>46</sup> La tiña de los pies es una micosis superficial, que guarda relación estrecha con la humedad, el calor y el

encierno propio del uso de zapatos, medias o calcetines de material sintético. Es causada por *T. rubrum*, en la mayoría de los casos, *T. mentagrophytes* ó *E. floccosum*; predomina en varones adultos, pero también se observa en mujeres y niños. Afecta pliegues interdigitales, plantas y bordes de los pies. Se manifiesta por escamas, maceración, grietas, y fisuras, vesículas y ampollas, escamas y áreas de hiperqueratosis, ó ulceraciones y costras melicéricas. Puede extenderse a los bordes del pie, a su cara dorsal, ó dar formas en mocasín o en calcetín. La evolución es crónica, se acompaña de prurito y olor fétido; cursa con exacerbaciones en épocas calurosas y remisiones en épocas frías. Leyva y colaboradores<sup>46</sup> encontraron que de 1,023 pacientes diagnosticados como pie de atleta, el 25.94% fue ocasionado por dermatofitos, el 5.70% por *Candida* y el 1.61% por otros agentes (*Trichosporon sp*, *Rhodotorula sp*, *Geotrichum sp* y *Cephalosporium sp*.)

### **A. Agentes causales**

Los microorganismo causales de las dermatofitosis se llaman dermatofitos, hongos queratinófilos que limitan su presencia a estructuras que contienen queratina, como pelos, uñas y capa córnea. Se han identificado 41 especies anamorfas, casi todas viven como saprófitos del suelo. Pertenecen a los géneros *Trichophyton*, *Microsporium* y *Epidermophyton*. En relación a su distribución ecológica se dividen en geófilos, zoófilos y antropófilos, según su adaptación en el suelo, animales ó humanos. El género *Trichophyton* tiene microconidios abundantes, globosos ó piriformes de 2 a 4 µm de diámetro y escasos macroconidios de paredes delgadas, fusiformes o elongados de 4 a 8 x 8 a 50µm. La especie más frecuente es *T. rubrum*, le sigue en importancia *T. mentagrophytes* que tienen múltiples variedades. Las cepas antropófilas se describen como vellosas (*T. mentagrophytes* var *interdigitale*) y producen poca inflamación y las zoófilas, como granulosas (*T. mentagrophytes* var *mentagrophytes*) con inflamación importante. Están en aumento las infecciones por *T. tonsurans* y son menos frecuentes *T. violaceum*, *T. verrucosum* y *T. concentricum*. El género *Microsporium* se caracteriza por macroconidios fusiformes de 7 a 20 x 30 a 60 µm, con extremos afilados y paredes gruesas y equinuladas, presentan de uno a 15 lóculos. La especie observada más a menudo y más importante en este grupo es *M. canis* que tiene dos variedades: *distortum* y *obesum*. El género *Epidermophyton* sólo tiene una especie patógena para seres humanos, *E. floccosum*, que es antropófila y nunca afecta pelos de la cabeza. Se caracteriza por macroconidios de 7 a 12 x 20 a 40µm de diámetro, de paredes delgadas y en forma de mazo o clava con un extremo redondeado, no hay microconidios.

Los agentes causales de las candidosis son levaduras anacosporadas, cuyo estado anamorfo pertenece a la subdivisión Deuteromycotina, y a su estado teleomorfo puede ser Ascomycotina ó Basidiomycotina. Se han descrito 81 especies, de las cuales al menos siete causan enfermedades en seres humanos (*C. albicans*, *C. guillemondii*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. stellatoidea*). El género *Candida* en sentido amplio es dimorfo. La mayor parte de las levaduras se encuentran en piel sana, excepto *C. albicans* y *C. tropicalis*, que se llegan a aislar de región perianal, peribucal y dedos. *C. albicans* se ha dividido en varios biotipos, y por sus características antigénicas en los serotipos A y B.

## **B. Patogénesis**

Como primer paso en la patogénesis de las infecciones cutáneas se requiere de la capacidad del microorganismo infectante para superar los factores de resistencia física e innata, favoreciendo una adhesión inicial, seguido de una competencia con la flora microbiana normal y la subsecuente colonización de las superficies celulares. Estudios con especies de *Trichophyton* han demostrado que la germinación de las arthroconidias en el estrato córneo son dependientes de varios factores.<sup>36</sup> Posterior a la germinación, se presenta la penetración de las hifas del estrato córneo a las capas profundas de la epidermis, y éste se considera el paso crítico de la iniciación de la infección.<sup>37</sup>

Se han implicado como factores de virulencia a las proteinasas extracelulares, lipasas o enzimas mucolíticas producidas por los microorganismos. Estas enzimas participan en la obtención de los nutrientes esenciales y ayudan al hongo para penetrar en los tejidos profundos del huésped. Se ha demostrado que los dermatofitos producen una variedad de proteinasas, incluyendo queratinasas que facilitan la penetración del tejido queratinizado. En forma semejante se ha demostrado la producción por *C. albicans* de varias enzimas extracelulares, especialmente proteinasas.<sup>38</sup>

La adhesión de *C. albicans* a las superficies celulares se ha atribuido a la presencia de glucoproteínas que contienen mananos en la pared celular del hongo, además de la presencia de tubos germinales que se han asociado con mayor capacidad de invasión y virulencia.<sup>39</sup>

Existen mecanismos para evadir la respuesta inmune del huésped dentro de los que se incluyen la acción de mananos que producen una reducción en la inflamación y la fagocitosis. Además se ha observado en *C. albicans* expresa un receptor iC3b, compitiendo con el C3b utilizado por los polimorfonucleares.<sup>40</sup>

La defensa del huésped a estas infecciones compromete tanto la respuesta innata como la adquirida. Proteínas del huésped como la transferrina y el complemento contribuyen a la resistencia mediante la restricción o la inhibición del crecimiento de los microorganismos y son parte de la resistencia innata del huésped.<sup>41</sup> Las histatinas salivales han demostrado acción inhibitoria para *C. albicans* y pueden contribuir a la resistencia en contra de la infección en la cavidad bucal. Por otro lado los polimorfonucleares, la proliferación celular y la queratinización tienen un papel muy importante en el inicio de la defensa del huésped mediante la restricción del microorganismo a las capas superficiales y promoviendo la eliminación rápida del hongo del sitio de infección.<sup>38</sup>

También se ha demostrado que el ambiente hormonal juega un papel importante en la patogénesis de las infecciones cutáneas. Tanto *C. albicans* como los dermatofitos tienen proteínas citosólicas de unión hormona-específica. Por lo menos tres proteínas de *C. albicans* se unen específicamente a diversos esteroides con gran afinidad y esteroespecificidad. Una sola proteína se une con la corticosterona y la progesterona con igual afinidad, mientras que el 17 $\beta$ estradiol, la hormona luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica humana se unen a otras proteínas específicas. Se ha propuesto como factor predisponente en las mujeres embarazadas la estimulación para la formación del tubo germinativo por estradiol y LH en las candidosis vaginales. La respuesta funcional a las hormonas es el incremento en el crecimiento y en la adhesión a las células epiteliales.<sup>38</sup>

La superficie cutánea representa una barrera para la invasión de dermatofitos, debido a que la exposición a radiación ultravioleta, la baja humedad y la competencia con

la microflora normal de la piel provee un ambiente hostil para el crecimiento fúngico. El estrato córneo por sí mismo actúa como barrera, debido a que constantemente está en renovación mediante la proliferación epidérmica y la queratinización. Los queratinocitos en la periferia de las dermatofitosis anulares presentan un incremento en el grado de división celular.<sup>42</sup> El desecho y el reemplazo del estrato córneo dificulta la penetración a estratos más profundos de la piel. Por otro lado la piel y los anexos producen diversas sustancias con actividad antifúngica. Los lípidos en el pelo de los adultos contienen ácidos grasos saturados que son altamente efectivos en contra de los organismos causantes de *tinea capitis*; las esfingosinas se han caracterizado como una barrera antimicrobiana en la piel.<sup>43</sup> La transferrina insaturada puede prevenir la invasión de los dermatofitos por la competencia por hierro en las capas más profundas de la piel.

Existe una relación inversa entre el grado de inflamación que se produce en las micosis superficiales y la duración de ésta. En general las tiñas producidas por *T. rubrum* son menos inflamatorias, pero más crónicas. Al estudio microscópico se observan cúmulos de neutrófilos en las lesiones agudas, y mononucleares en las crónicas. Parece ser que la inflamación estimula la proliferación epidérmica, que se corrobora al observar la hiperqueratosis y la paraqueratosis. Las células inflamatorias son atraídas al sitio de la infección por varios mecanismos. Los dermatofitos han demostrado ser capaces de activar la cascada del complemento produciendo factores quimiotácticos. Se ha demostrado que *T. rubrum* destruye el suero con actividad quimiotáctica<sup>44</sup>, por el otro lado *T. mentagrophytes* libera factores quimiotácticos de bajo peso molecular análogos a los que producen las bacterias. También los queratinocitos producen factores como IL-8 y leucotrieno B4 en respuesta a estímulos adecuados.<sup>38</sup>

Los neutrófilos y los macrófagos juegan un papel importante en la defensa en contra de las infecciones micóticas superficiales. Los neutrófilos producen oxidantes microbicidas como los aniones superóxido, el peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, así como componentes granulares no oxidativos como las catepsinas, defensinas, la proteína que incrementa la permeabilidad y la actividad bactericida, lactoferrinas, lisozimas, elastasas y azuricidas.<sup>45</sup> Los macrófagos producen radicales libres y óxido nítrico para inhibir el crecimiento del hongo. Aún se siguen investigando los elementos de la respuesta inmune cutánea.

## Planteamiento del problema

¿Se expresa la defensina humana  $\beta 2$  en el pie de atleta?

## Justificación

- i. Aportar nuevos conceptos en la patogénesis del pie de atleta:
  - a. La inmunidad innata como mecanismo de defensa fundamental en la epidermis para controlar el desarrollo del pie de atleta.
    - i. La expresión inducible de la hBD-2, como péptido antimicrobiano, en el pie de atleta.
    - ii. La hBD-2 como parte de la inmunidad innata y su relación con los dermatofitos, y/o *Candida*.
2. Justificar la investigación sobre nuevas estrategias terapéuticas.
  - a. Inducción en la expresión de la hBD-2, como péptido antimicrobiano de la inmunidad innata, en contra los patógenos implicados en el pie de atleta.
  - b. Producción de la hBD-2 para aplicación tópica.
3. Establecer pautas para nuevos estudios como hibridación *in situ*, y poder determinar el sitio de acción de las defensinas en la piel de pacientes con infección por dermatofitos, y/o *Candida*.
4. Dirigir la investigación de los mecanismos de acción específicos de la hBD-2 en contra de los patógenos del pie de atleta.

## Objetivos primarios

1. Determinar la expresión de la hBD-2 mediante técnica de RT-PCR, en la piel de pacientes con pie de atleta.
2. Comparar la expresión de la hBD-2 en la piel afectada y la piel sana.

## Objetivos secundarios

1. Determinar los agentes causales del pie de atleta.
2. Determinar si existe alguna relación entre el agente causal y la expresión de la hBD-2.



## **Diseño**

### Diseño del estudio

Estudio abierto de escrutinio, observacional, comparativo y de corte transversal, en el que los sujetos que cumplieron con los criterios de inclusión y superaron los de exclusión, fueron invitados a participar de manera voluntaria.

## **Material y métodos**

### Población de estudio

Los pacientes elegibles fueron seleccionados en forma secuencial a la consulta externa del Departamento de Dermatología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" con el diagnóstico clínico de pie de atleta.

### Tamaño de la muestra

Debido a que es un estudio original de escrutinio y no existen antecedentes o investigaciones previas similares que sirvan como modelo, no existen fundamentos para hacer un cálculo del tamaño de una muestra representativa que permita hacer inferencias de los resultados. Por lo tanto se seleccionaron 15 pacientes consecutivos (30 biopsias) que reunieron los criterios de inclusión.

### Criterios de inclusión

Se incluyeron los pacientes que reúnan los siguientes criterios:

1. Pacientes adultos (18 a 65 años de edad).
2. Con el diagnóstico clínico y microbiológico de pie de atleta.
3. Todos aquellos pacientes que hayan aceptado participar en el estudio y que hayan firmado la carta de consentimiento informado.

### Criterios de exclusión

1. Pacientes que cursen con otras enfermedades que modifiquen la respuesta inmunitaria:
  - a. diabetes mellitus
  - b. colagenopatías
  - c. inmunodepresión (neoplasia, trasplante, VIH, fármacos)
2. Pacientes con tratamiento antimicótico o antiinflamatorio tópico y/o sistémico en las 2 semanas previas a su ingreso.

### Consideraciones éticas

“Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de la Salud en Materia de Investigación para la salud que se incluye en el título 2º capítulo I del artículo 17: investigación de riesgo mínimo.”

### Variables

Independientes: edad y sexo, manifestaciones clínicas, extensión de la dermatosis, patología agregada.

Dependientes: expresión de la defensina humana  $\beta 2$ .

### Parámetros de medición

1. La expresión de la defensina humana  $\beta 2$  se define como positiva cuando se encuentre una banda en el gel de agarosa que se localice en 255 pares de base.

## **Recursos**

### 1. Recursos Humanos

#### Investigador principal:

Marcela Saeb Lima

Residente del tercer año del departamento de dermatología

#### Investigador responsable:

Roberto Arenas Guzmán

Jefe Sección de Micología Hospital General Dr. Manuel Gea González

#### Colaboradores:

Química Gisela Cabrera

Biólogo Gabriel Sandoval

Bióloga Ana Vega

Departamento de Investigación de Alergia e Inmunología

Dr. Luis Manuel Terán

Jefe del Departamento de Investigación de Alergia e Inmunología

Dr. Gustavo Reyes-Terán

Jefe de la Sección de Investigación en la patogénesis del SIDA

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

## 2. Recursos Materiales

### Presupuesto del protocolo de investigación\*

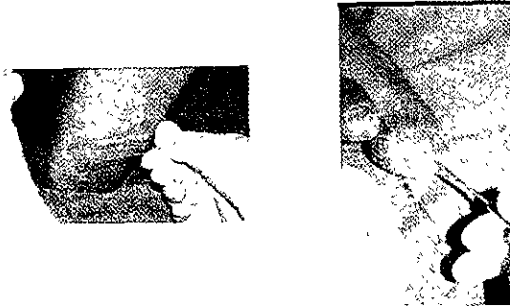
Descripción	Precio unitario dólares	Cantidad
0.25 ml end type PK/1000 cole-parmer	135.00	1
0.5 ml PK/500 cole-parmer	55.00	1
Trizol reagent 200 ml GIBCO	300.00	1
Oligonucleotids HBD-2 (21 pair bases)	63.80	3
Oligo(DT) 12 a 18 primers 25µg	66.00	1
DATP 25 µmol	72.00	1
DCTP 25µmol	72.00	1
DGTP 25µmol	72.00	1
DTTP 25µmol	72.00	1
Minimum essential medium 500ml	21.00	1
DNase amplification grade 100UI	81.00	1
10 mM dNTP MIX 100µmol	65.00	1
Thermo script RT-PCR system 25 reac	138.00	1
Thermo script RT-PCR system 500U	162.00	1
Superscript RNase reverse transcriptase	200.00	1
Oligonucleotid OL26 26 pair bases	43.40	1
Celda con tapa cuadrada 1 pza	200.00	1
Guantes chicos PK/100	65.00	1
Tubos 0.5ml graduados MCA Labsen	28.00	1
Bolsa 1000		
Strat cooler de mesa para 24 tubos 1.5ml	290.00	1
Expand TM high fidelity PCR system	1000.00	1
Random hexamer primers	66.00	1
6 PAQ amplitaq W/10X bufferII	777.48	1
Cloroform F 500 ml	60.00	1
Puntas para micropipeta de polipropileno	55.00	1
Finnipipette digital FDI 200-1000UL	40.00	1
Puntas universales amarillas (bolsa 1000pzas)	10.00	1
<b>Total</b>	<b>4209.20</b>	

\*Presupuesto otorgado por Janssen-Cilag México a beneficio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, sede en la cual se llevó a cabo el protocolo de investigación.

## Técnicas

### Obtención de las muestras microbiológicas

Se realizó examen directo de las lesiones mediante la técnica de raspado con lo que se obtuvo escama de la piel afectada. Se colocó la escama en un portaobjetos, y se aplicó hidróxido de potasio con dimetilsulfóxido y negro de clorazol. Con la observación microscópica de la escama se determinó como examen positivo cuando se observaron filamentos largos ó tabicados y artrosporados, levaduras y/ó filamentos. Se sembró el agente causal en medio de cultivo de Sabouraud con antibiótico y/ó Sabouraud para aislar el patógeno. Una vez cultivado se identificó la especie por el estudio macroscópico de la colonia y su correspondiente examen microscópico. (figura 1)



### Obtención de las biopsias

Previa asepsia del área con alcohol, se infiltró 0.5 ml de anestésico (xilocaína con o sin epinefrina al 2% según la región anatómica), con una jeringa de insulina. Posteriormente se colocó un campo estéril, y se procedió a la toma de la biopsia de espesor parcial con sacabocado de 3.5 mm, tanto de la piel afectada como de la piel sana de la extremidad ipsilateral. Se aplicó al defecto una solución de cloruro de aluminio al 50% como hemostático y posteriormente petrolato sólido. Se cubrió con una gasa estéril, y se sujetó con microporo. Se indicó al paciente que realizara curaciones de los sitios de biopsia diariamente, con agua oxigenada y petrolato sólido. (figura 2)



### Transporte y almacenamiento

Una vez obtenida la muestra de piel se introdujo en viales Eppendorf® con 1 ml de medio de transporte mínimo esencial (MEM, BioConcept, Freiburg). Se congeló la muestra inmediatamente a  $-70^{\circ}\text{C}$ . (figura 3)



### Extracción de RNA de tejido

Se agregó inicialmente 1.0 ml de TRIzol (Gibco-BRL) más 200 $\mu\text{l}$  de cloroformo, se agitó en vortex y se mantuvo a temperatura ambiente por 3 minutos. Se centrifugó a 9750 r.p.m. durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se recuperó el sobrenadante y se precipitó con 500 $\mu\text{l}$  de isopropanol. Se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se volvió a centrifugar a 9750 r.p.m. durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se desechó el sobrenadante y se agregó 1.0 ml de etanol al 75% con agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato) al 0.2%. Se centrifugó durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se desechó el sobrenadante y se dejó secar. Se resuspendió el RNA en agua tratada con DEPC al 0.2% y se midió por densitometría óptica a 260 y 280nm. (figura 4)



### Técnica de RT-PCR

Se utilizó 1µg de RNA (extraído del tejido), y se agregaron 3µl de una mezcla de DNAsa. Se incubó la mezcla, a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se agregaron 1.5µl de EDTA, con la finalidad de neutralizar a la DNAsa. Se incubó a 65°C durante 10 minutos, y posteriormente se mezcló con 1.0 µl de oligodT, que se incubó nuevamente a 70°C por 10 minutos. Se agregaron 4µl de buffer 5X, 2µl de DTT, 1.0 µl de dNTPs (dinucleótido de trifosfato). Se incubó a 42°C durante 2 minutos. Finalmente se agregó 1.0 µl de la enzima superscriptII. Se colocó la muestra en el termociclador con el siguiente programa: 50 minutos a 42°C y 15 minutos a 70°C.

### Técnica de PCR

Se utilizaron 5µl de cDNA más 100 pmol de cada uno de los primers (hBD-2: 5'-GGA GCC CTT TCT GAA TCC GCA-3' y 5'-CCA GCC ATC AGC CAT GAG GGT-3'), para producir segmentos de 255 pares de bases. Posteriormente se agregaron 1.0 µl de cada uno de los dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), buffer 10X, cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) y 1.0 µl de la enzima polimerasa (Expand). Para completar un volumen total de 25 µl se agregó agua destilada con DEPC. Se utilizó como control la amplificación de la enzima gliceroaldehído 3-fosfatodeshidrogenasa con los siguientes primers: 5'-CCA GCC GAG CCA CAT CGC TC -3' y 5'-ATG AGC CCC AGC CTT CTC CAT -3', produciendo segmentos de 360 pares de bases.

### Electroforesis

En un gel de agarosa al 2% se introdujeron las muestras obtenidas de la técnica de PCR, y se dejaron correr durante 30 a 40 minutos con una carga de 100V.

## Resultados

### 1. Pacientes

Se incluyeron 15 pacientes, de los cuales 9 fueron del sexo masculino y 6 del sexo femenino; con un rango de edad de 18 a 57 años y con un promedio de 38.13 años. Doce pacientes (80%) eran residentes del Distrito Federal, un paciente de Morelos, Estado de México y Guadalajara, respectivamente. (Tabla 1)

Paciente	edad	sexo	Evolución	Topografía	Examen directo	Cultivo del pie	RT-PCR
1 prima	1	44 femenino	15 años	plantas, interdigital	fiels	neg	neg neg
	2	54 masculino	1 mes	plantas, interdigital	fiels atrosporados	neg	neg
2 prima	3	44 masculino	1 año	plantas, interdigital	fiels	<i>Geotrichum</i>	neg neg
3 prima	4	24 masculino	7 años	plantas, interdigital	fiels	neg	neg neg
4 prima	5	36 masculino	desconoce	plantas	neg	<i>Candida sp</i>	neg neg
5 prima	6	52 masculino	7 meses	plantas	fiels	neg	neg neg
6 prima	7	41 masculino	3 meses	plantas, interdigital	fiels	<i>T. rubrum</i>	neg neg
7 prima	8	43 femenino	3 años	plantas, interdigital	fiels	neg	neg neg
8 prima	9	39 femenino	3 años	planta pie der	fiels	neg	neg neg
9 prima	10	18 masculino	8 meses	plantas, interdigital	fiels	<i>Candida sp</i>	neg neg
10 prima	11	43 masculino	15 días	plantas, interdigital	fiels	<i>Candida sp</i>	neg neg
11 prima	12	57 masculino	5 años	plantas, interdigital	fiels	<i>Candida sp</i>	neg neg
12 prima	13	19 femenino	7 meses	plantader interdigital	fiels	<i>T. rubrum</i>	positivo neg
13 prima	14	38 femenino	15 días	plantas	fiels	<i>Candida albicans</i>	neg
14 prima	15	20 femenino	3 años	plantas, interdigital	fiels	<i>Geotrichum/ Candida sp</i>	neg neg
15 prima							neg

Tabla 1. Presentación de los casos y controles, denominados con el número y la palabra prima. En esta tabla observamos la relación de datos entre los pacientes y entre los casos y controles.

### 2. Diagnósticos

## 2. Diagnósticos

Todos los pacientes fueron derivados a la sección de Micología con el diagnóstico de pie de atleta, y de éstos el 93.33% presentaron concomitantemente onicomomicosis. El 73.33% de los pacientes presentó involucro de la región plantar y el área interdigital, mientras que el 26.67% solamente de la región plantar. En el 100% de los pacientes morfológicamente había evidencia clínica de eritema y escama, en el 46.66% costras hemáticas, en el 20% vesículas, en el 13.33% liquenificación, y en el 73.33% queratosis. La evolución del pie de atleta fluctuaba entre los 15 días a 15 años. El 66.66% presentaba prurito. (figura 5)

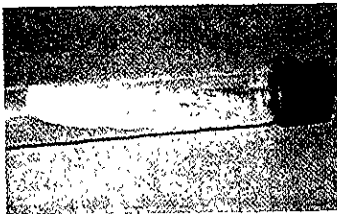


## 3. Examen directo

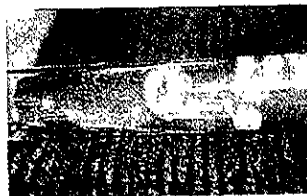
En todos los pacientes se observaron filamentos en el examen directo.

## 4. Resultado del cultivo

El 60% de los cultivos fueron negativos, y del 40% que resultaron positivos el agente causal en el 22.22% fue *Trichophyton rubrum*, el 55.5% *Candida* sp, el 11.11% *C. albicans*, el 22.22% *Geotrichum*. (El total no suma 100% ya que en uno de los cultivos se aisló flora mixta de *Geotrichum* y *Candida* sp). (figura 6)



*Candida* sp



*T. rubrum*



### 5. Extracción del RNA de las muestras de los casos y controles

<b>Paciente</b>	<b>RNA microgramos /9microlitros</b>
1	0.864
1 prima	1.044
2	3.816
2 prima	7.884
3	0.504
3 prima	0.612
4	0.612
4 prima	0.396
5	3.204
5 prima	1.872
6	36.72
6 prima	23.796
7	23.176
7 prima	29.988
8	28.044
8 prima	26.028
9	7.668
9 prima	6.228
10	4.788
10 prima	7.416
11	1.188
11 prima	0.72
12	12.6
12 prima	2.808
13	31.14
13 prima	24.444
14	1.08
14 prima	1.26
15	1.44
15 prima	0.108

Tabla II. Se muestra en esta tabla el valor en microgramos por 9 microlitros de RNAm que fue extraído de ambas muestras del tejido. Se puede observar que en algunos casos la cantidad de RNAm era menor a un microgramo, por lo que se utilizó el volumen total, en los otros se calculó el volumen para utilizar en el RT-PCR un microgramo.

## 6. Expresión de hBD-2

En ningún paciente se detectó la banda de la hBD-2, excepto en un paciente femenino de 19 años de edad, quien presentaba un solo pie afectado, por *T. rubrum*, con una evolución de 7 meses, y quien no había recibido tratamientos previamente. La muestra control de este paciente, al igual que en el resto de los pacientes fue negativa. (figura 7)

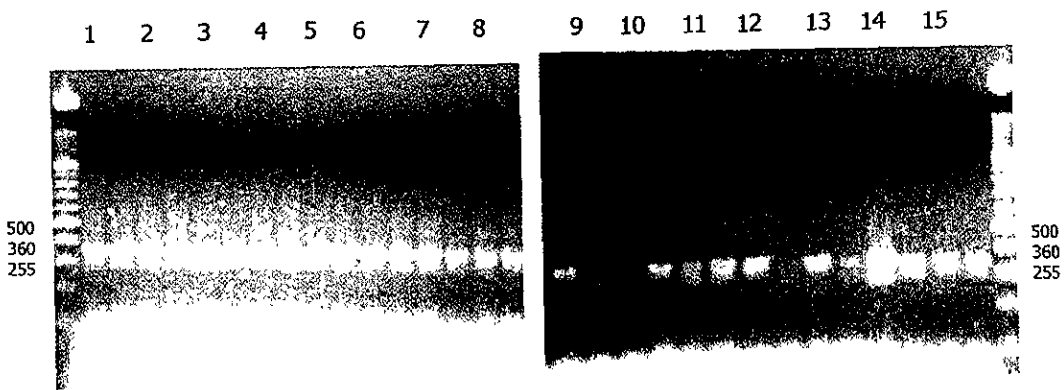


Figura 7. Se muestra solamente la evidencia de la GAPDH de 360 pares de bases, y no existe evidencia de la banda de la HBD-2 de 255 pares de bases, excepto en el caso no. 13, que se observa una banda muy tenue. Los números superiores corresponden a los casos con su correspondiente banda del control.

## Discusión

Debido a que las micosis superficiales ocupan uno de los diez primeros lugares de la consulta dermatológica, es de especial interés poder determinar los factores que se involucran en la patogénesis de éstas, y que mantienen a estas enfermedades con una elevada prevalencia. Es bien sabido que afectan a individuos de cualquier edad, raza o sexo, así como de cualquier medio socioeconómico u ocupación. Clínicamente se clasifican en formas superficiales que incluyen la tiña de la cabeza, tiña del cuerpo, tiña imbricada, tiña inguinal, tiña de la mano, tiña de los pies (pie de atleta), tiña de las uñas.

El término de pie de atleta, se ha utilizado para referirse a los padecimientos del pie ocasionados por dermatofitos como la tiña de los pies, pero también para las manifestaciones causadas por hongos como *Candida* y *Trichosporon*.<sup>46</sup> La tiña de los pies es una micosis superficial, que guarda relación estrecha con la humedad, el calor y el encierro propio del uso de zapatos, medias o calcetines de material sintético. Es causada por *T. rubrum*, en la mayoría de los casos, *T. mentagrophytes* ó *E. floccosum*, predomina en varones adultos, pero también se observa en mujeres y niños. Afecta pliegues interdigitales, plantas y bordes de los pies. Se manifiesta por escamas, maceración, grietas, y fisuras, vesículas y ampollas, escamas y áreas de hiperqueratosis, ó ulceraciones y costras melicéricas. Puede extenderse a los bordes del pie, a su cara dorsal, ó dar formas en mocasín o en calcetín. La evolución es crónica, se acompaña de prurito y olor fétido; cursa con exacerbaciones en épocas calurosas y remisiones en épocas frías. A pesar de que se reporta ampliamente en la literatura<sup>46</sup> que el agente causal más frecuentemente encontrado es *T. rubrum*, en estos 15 pacientes hubo un predominio de *Candida* sp (5 casos), y solo en 2 casos *T. rubrum*. Es probable que este aparente predominio de *Candida* se deba a la muestra tan pequeña, o este dato puede no ser fidedigno, ya que el examen directo fue negativo en el 60% de los casos, y solo se recobró el agente causal en el 40%, dato que concuerda con aislamientos previos en e servicio.<sup>47-48</sup> Por ser una población tan pequeña no podemos afirmar que exista un cambio en la frecuencia del agente etiológico del pie de atleta, solamente consideramos este dato valioso en el sentido que la flora microbiológica del pie de atleta es mixta y no podemos asegurar con el cuadro clínico, para todos los casos el diagnóstico de tiña de los pies.

Conocemos los agentes etiológicos del pie de atleta, pero poco sobre su interacción con la superficie cutánea, la cual representa una barrera para la invasión de dermatofitos, debido a que provee un ambiente hostil para el crecimiento fúngico. Está claro que el estrato córneo por sí mismo actúa como barrera, debido a que constantemente está en renovación mediante la proliferación epidérmica y la queratinización.<sup>42</sup> Por otro lado la piel y los anexos producen diversas sustancias con actividad antifúngica; por ejemplo los lípidos en el pelo de los adultos contienen ácidos grasos saturados que son altamente efectivos en contra de los organismos causantes de *tinea capitis*, por otra parte, las esfingosinas se han caracterizado como una barrera antimicrobiana en la piel.<sup>43</sup> La transferrina insaturada puede prevenir la invasión de los dermatofitos por la competencia por hierro en las capas más profundas de la piel. Todo estos factores forman parte de la inmunidad innata, a la que corresponden también las defensas humanas. Estas se incluyen dentro del grupo de los péptidos antimicrobianos catiónicos, que presentan una conformación de una hoja beta, con seis cisteínas y tres puentes disulfuro. Están enriquecidos con residuos de arginina y lisina, lo que les da una

carga positiva a pH neutro. Son solubles en agua o en una solución salina y son resistentes a la desnaturalización por calor. Son activas en concentraciones bajas de sal e inactivas a concentraciones altas de ésta. Existen dos grupos, las defensinas- $\alpha$  y defensinas- $\beta$ , siendo estas últimas de mayor tamaño. Su actividad antimicrobiana requiere de la interacción del péptido catiónico con los componentes aniónicos de las membranas lipídicas de las bacterias, virus, hongos ó protozoarios.<sup>26</sup> La muerte por lisis celular ocurre en unos cuantos minutos, y depende de la concentración del péptido antimicrobiano.<sup>2,13</sup> Hader y cols demostraron la presencia de la hBD-2 en la piel de pacientes con psoriasis, así mismo se determinó mediante la técnica de RT-PCR que la expresión de esta proteína es inducible ya que observaron una baja expresión del RNA mensajero (RNAm) en los queratinocitos derivados de la piel, pero al ser estimulados con el factor de necrosis tumoral alfa, se observó aumento en la expresión de la hBD-2. Este incremento también se corroboró al estimular a los queratinocitos con bacterias gram positivas y negativas, así como *C. albicans*.<sup>25</sup> De forma experimental intentamos mediante la misma técnica determinar la expresión de la hBD-2 en el pie de atleta, que como ya hemos observado no es causado únicamente por dermatofitos sino por *Candida* y *Trichosporon*. En el primer estudio realizado con muestras de pacientes obtenidas tanto de las lesiones como de la piel sana, no logramos detectar la expresión de la hBD-2, excepto en un paciente femenino de 19 años de edad, con tiña de los pies producido por *T. rubrum*, que corresponde al 6% (1 caso) de todos los casos.

Estos resultados nos llevan a formular varias hipótesis: es probable que la población que se encuentra afectada por alguna micosis superficial no induzca la expresión de la hBD-2 y por este mecanismo se favorezca el desarrollo de los hongos, y la persistencia a través del tiempo. Se ha determinado la estrecha relación que presentan las defensinas beta con el HLA de la clase II DR2 y DR4<sup>47</sup> para su expresión, y es probable que exista alguna alteración de esta relación en estos pacientes. Para demostrar esto podríamos tomar como población cautiva, aquellos pacientes que presentan la tiña imbricada o *tokelau*, que es una micosis superficial causada por un solo agente etiológico, *T. concentricum*, y que se presenta en determinadas zonas geográficas y grupos étnicos, en los que se supone exista una predisposición genética. Se caracteriza por ser la más seca y superficial de las tiñas y presenta escamas que se adhieren por uno de sus bordes, muestran disposición concéntrica y adoptan aspecto de encaje.<sup>35</sup>

Es probable también que no se demostrara la expresión de la hBD-2, debido a que no estimulamos a los queratinocitos de las muestras obtenidas de los pacientes, con el factor de necrosis tumoral alfa o con IL-1 $\beta$ , como en el estudio original<sup>25</sup>, sino que directamente buscamos la expresión *in vivo* de la hBD-2. Este procedimiento, a pesar de que sería altamente específico para la búsqueda de la hBD-2, podría modificar los resultados de un primer estudio experimental al no demostrar si directamente los hongos que producen el pie de atleta tienen la capacidad de inducir la expresión de este péptido antimicrobiano.

Por otro lado podemos suponer que las diversas especies aisladas de estos pacientes, no poseen la capacidad de inducir la expresión de las defensinas, y habría que observar la expresión mediante la estimulación de queratinocitos en cultivo con dichos agentes causales y con otros de géneros diferentes.

A pesar de que la técnica de ELISA o Southern Blot probablemente determinarían con mayor sencillez la presencia de hBD-2, actualmente la técnica de RT-PCR es la herramienta que se encuentra establecida para los parámetros de la hBD-2 (temperatura, concentración de magnesio, concentración del cDNA, etc). Así también es la técnica que

nos permite determinar a partir de un tejido si se está sintetizando el RNAm que de origen al péptido que queremos estudiar. Por lo que consideramos que en este protocolo de investigación que no se había realizado previamente, es la técnica indicada.

A pesar de que el estudio no demostró la presencia de la hBD-2 en el pie de atleta, estos resultados generan nuevas hipótesis en el estudio de las defensinas y en la patogénesis de las micosis superficiales; que a pesar de la alta prevalencia de éstas, conocemos poco la fisiopatología. Consideraríamos inclusive que en la actualidad, las modalidades terapéuticas se modifiquen por estimuladores de la respuesta inmune innata, o específicamente por la aplicación de un péptido con actividad antifúngica, como ocurre con la proteína bactericida que aumenta la permeabilidad (BPI), que actualmente produce la Corporación XOMA (Berkeley, CA) con el nombre comercial de Mycoprex™, la cual tiene la capacidad de matar ciertas bacterias, neutralizar endotoxinas y que tener cierta actividad antifúngica.

## Conclusión

En los últimos años se ha realizado gran investigación en los mecanismos de defensa cutánea que involucra a la inmunidad innata. Si bien no es un solo mecanismo el responsable de prevenir las infecciones, sino la interacción de varios factores, que responden rápidamente a la invasión de microorganismos y previenen la colonización y multiplicación. Resulta de gran trascendencia seguir una línea de investigación sobre la respuesta inmune innata y su relación con citocinas, quimocinas y la respuesta inmune adaptativa. Recientemente se publicó la interacción entre la defensina humana beta y el receptor CCR6, de las quimocinas, en las células dendríticas inmaduras y las células T de memoria, lo que supone que estas defensinas pueden promover la respuesta inmune adaptativa mediante el reclutamiento de las células T a los sitios de invasión por microorganismos.<sup>50</sup>

**ANEXO 1**

Hoja de captura de datos

No. de paciente: -----

Fecha de ingreso: -----

Nombre del paciente: -----

Edad: ----- Sexo: ----- O/R: -----

Ocupación: -----

Domicilio: -----

Teléfono: -----

Topografía de la micosis superficial: -----

Morfología: -----

Evolución: -----

Examen directo: -----

Cultivo: -----

Examen microscópico del cultivo: -----

RT-PCR

## ANEXO 2

### Carta de consentimiento informado

Por medio de este conducto expreso que he sido informado (a) de manera completa y clara para participar en el estudio: Determinación de la expresión de la defensiva humana beta 2 en el pie de atleta mediante la técnica de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Yo doy voluntariamente mi consentimiento para participar y he recibido una copia firmada de esta forma de consentimiento.

Puedo rehusarme a participar o abandonar el estudio en cualquier momento durante toda su duración sin penalización ó pérdida de la atención médica.

Estoy de acuerdo en que se tomen fragmentos de piel para el estudio, y estoy consiente que los riesgos de este procedimiento son mínimos.

Podré preguntar y seré informado (a) sobre los resultados de este estudio.

Este estudio tiene como meta contribuir al conocimiento sobre las infecciones por hongos en la piel; las cuales son causa frecuente de la consulta dermatológica, y producen un costo alto para el tratamiento, por las recaídas y la dificultad para eliminar al hongo.

Acepto participar en el estudio

Testigo

-----  
Nombre y firma del paciente

-----  
Nombre y firma

Testigo

-----  
Nombre y firma

## Referencias

1. Fearon DT: Seeking wisdom in innate immunity. *Nature* 1997; 388: 323-4.
2. Gallo RL, Huttner KM. Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* 1998; 111(5): 739-43.
3. Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 61-92.
4. Broekaert WR, Cammune BPA, DeBolle MFC, et al. Antimicrobial peptides from plants. *Crit Rev Plant Sci* 1997; 16: 297-323.
5. Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 1981; 292: 246-8.
6. Boman HG. Cecropina: antibacterial peptides from insects and pigs. In: Hoffmann J, Natori S, Janeway C, eds. *Phylogenetic Perspectives in Immunity: The Insect-Host Defense*. Austin: RG Landes Biomedical Publisher, 1994: 24-37.
7. Lee JY, Boman A, Sun C, et al. Antibacterial peptides from pig intestine: Isolation of a mammalian cecropin. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 9159-62.
8. Selsted ME, Szklarek D, Lehrer RI. Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides from rabbit granulocytes. *Infect Immun* 1984; 45: 150-4.
9. Selsted ME, Harwig SSL, Ganz T, et al. Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest* 1985; 76: 1436-9.
10. Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 5449-53.
11. Soravia E, Marini G, Zasloff M. Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus* granular gland secretions. *FEBS Lett* 1988; 228: 337-40.
12. Hancock, REW. Peptide antibiotics. *The Lancet* 1997; 349(9049): 418-22.
13. Ganz T, Lehrer RI. Defensins. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 584-9.
14. Bevins CL, Zasloff M. Peptides from frog skin. *Ann Rev Biochem* 1990; 59: 395-414.
15. Liu L, Ganz T. The pro region of human neutrophil defensin contains a motif that is essential for normal subcellular sorting. *Blood* 1995; 85: 1095-1103.
16. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SSL, et al. Defensins: natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 1985; 76: 1427-35.
17. Lehrer RI, Ladra KM, Hake RB. Nonoxidative fungicidal mechanisms of mammalian granulocytes: demonstration of components with Candidacidal activity in human, rabbit, and guinea pig leukocytes. *Infect Immun* 1975; 11: 1226-1234.
18. Reilly DS, Tomassini N, Bevins CL, Zasloff M. A Paneth cell analogue in *Xenopus* small intestine expresses antimicrobial peptide genes: conservation of an intestinal host-defense system. *J Histochem Cytochem* 1994; 697-704.
19. Zanetti M, Litteri L, Griffiths G, et al. Stimulus-induced maturation of provactenecins, precursors of neutrophil antimicrobial polypeptides. *J Immunol* 1991; 146: 4295-4300.
20. Diamond G, Russell JP, Bevins CL. Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 5156-60.
21. Russell JP, Diamond G, Tarver AP, et al. Coordinate induction of two antibiotic genes in tracheal epithelial cells exposed to the inflammatory mediators lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 1996; 64: 1565-8.
22. Diamond G, Jones DE, Bevins CL. Airway epithelial cells are the site of expression of a mammalian antimicrobial peptide gene. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 4596-4600.



23. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, et al. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* 1997; 272: 15258-63.
24. Ganz T, Weiss J. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Semin Hematol* 1997; 34: 343-54.
25. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997; 387: 861.
26. Boman HG. Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review. *Scand J Immunol* 1998; 48: 15-25.
27. Valore EV, Martin E, Harwig SSL, Ganz T. Intramolecular inhibition of human defensin HNP-1 by its propeptide. *J Clin Invest* 1996; 97: 1624-9.
28. Schonwetter BS, Stolzenberg ED, Zasloff MA. Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 1995; 267(5204): 1645-8.
29. Bevins CL, Jones DE, Dutra A, et al. Human enteric defensin genes: chromosomal map position and a model for possible evolutionary relationships. *Genomics* 1996; 31: 95-106.
30. Liu LD, Zhao CQ, Heng HHQ, Ganz T. The human beta-defensin-1 and alpha-defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry. *Genomics* 1997; 43: 316-20.
31. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, et al. Human beta-defensin 1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 1997; 88: 553-60.
32. Falconer A, Ali RS, Quinn AG. Expression of human beta defensin 1 and human beta defensin 2 in normal human skin. *Br J Dermatol* 1999; 140(4): 789.
33. Fulton C, Anderson GM, Zasloff M, et al. Expression of natural peptide antibiotics in human skin. *Lancet* 1997; 350(9093): 1750-1.
34. Milner SM, Ortega MR, Kucan JO, et al. Human beta-defensin expression in burned and injured skin. *Br J Surg* 1998; 85(6): 864-5.
35. Arenas R. Dermatofitosis; Pitiriasis versicolor; Candidosis, en *Micología Médica Ilustrada*, 1ª ed. México: Interamericana-McGraw-Hill, 1993: 57-82, 223-34.
36. Tsuboi R, Ogawa H, Bramono K, et al. Pathogenesis of superficial mycoses. *J Med Vet Mycol* 1994; 32(Suppl 1): 91-104.
37. Aljabre SHM, Richardson MD, Scott EM, et al. Germination of *Trichophyton mentagrophytes* on human stratum corneum in vitro. *J med Vet Mycol* 1992; 30: 145-52.
38. Ogawa H, Summerbell RC, Clemons KV, et al. Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses. *Medical Mycology* 1998; 36(Suppl 1): 166-73.
39. Calderone RA, Braun PC. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* 1991; 55: 1-20.
40. Gustafson KS, Vercellotti GM, Bendel CM, Hostetter MK. Molecular mimicry in *Candida albicans*. *J Clin Invest* 1991; 87: 1896-1902.
41. Dahl MV. Dermatophytosis and the immune response. *J Am Acad Dermatol* 1994; 31: S34-S41.
42. Berk SH, Penneys NS, Weinstein GD. Epidermal activity in annular dermatophytosis. *Arch Dermatol* 1976; 112: 485-8.
43. Bibel DJ, Aly R, Shah S, Shinefield HR. Sphingosines: antimicrobial barriers of the skin. *Acta Dermatol Venereol* 1993; 73: 407-11.
44. Swan JW, Dahl MA, Coppo PA, Hammerschmidt DE. Complement activation by *Trichophyton rubrum*. *J Invest Dermatol* 1983; 80: 156-8.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

45. Thomas EL, Lehrer RI, Rest RF. Human neutrophil antimicrobial activity. *Rev Infect Dis* 1988; 10(Suppl 2): S450-6.
46. Leyva J, Méndez P, Arenas R. Pie de atleta. Datos actuales sobre su causa en la Ciudad de México. *Dermatología Rev Mex* 1998; 42(2): 58-62.
47. Arenas R, Ocejo D. Onicomycosis: frecuencia actual en un departamento de dermatología de la Ciudad de México. *Dermatología Rev Mex* 1997; 41(5): 171-5.
48. Vázquez del Mercado, Arenas R. Epidemiología y causas de la tiña del cuerpo. Experiencia de cinco años. *Dermatología Rev Mex* 1999; 43(6): 260-3.
49. Kaibacher H, Halder T, Dressel D, et al. Molecular modelling of defensin bound to HLA-DR4. *J Invest Dermatol* 1998; 110(4): 483
50. Yang, Chertov, Bykovskaia, Schröder JM, et al. *Science* 1999; 286: 525-8.