

ESPOROTRICOSIS

LINFOCITOS FORMADORES DE ROSETAS EN PACIENTES CON LA FORMA CUTÁNEA DE LA ENFERMEDAD

M. L. ESCOBAR, M. E. MEDINA, F. MONTOYA

En 21 pacientes con esporotricosis linfocutánea se cuantificaron los linfocitos formadores de rosetas E totales, activas y estables. Se determinaron, además, posibles factores circulantes moduladores de la formación de rosetas E, tanto en el suero de casos como de controles. Los resultados demuestran la inexistencia de factores séricos moduladores y no se detectaron modificaciones en las subpoblaciones de linfocitos analizadas.

Se concluye que las fallas en los mecanismos de respuesta inmune del individuo con esporotricosis tegumentaria, radican en sitios diferentes de las poblaciones linfoides, quizás en la capacidad lítica de sus células fagocíticas.

INTRODUCCION

La esporotricosis es la micosis producida por el *Sporothrix schenckii* y constituye una de las micosis más prevalentes en Colombia (1,2). Usualmente compromete la piel, el tejido subcutáneo y los linfáticos regionales (3). Este tipo de presentación es el más frecuente pero ocasionalmente puede comprometer pulmones, huesos, articulaciones y meninges como si se tratara de una micosis sistémica (4, 5). Es poco lo que conocemos sobre los mecanismos de interacción agente-huésped en la esporotricosis y las alteraciones inmunológicas del individuo enfermo apenas empiezan a dilucidarse (6). En los pacientes con esporotricosis sistémica se han postulado algunos defectos inmunológicos, ya que más de la mitad de los casos presentan una enfermedad maligna de

base (4,5). Pluoffe et al (7) demostraron en 6 pacientes con la forma sistémica, anergia cutánea a varias estimulinas, incluida la esporotriquina, así como defectos en la linfoblastotransformación, tanto inducida por mitógenos como por antígenos del propio hongo. En 5 pacientes con la forma cutánea, no demostraron anormalidades. Respecto a la cuantificación de poblaciones de linfocitos, en cuatro pacientes con la forma sistémica no detectaron alteraciones. En los casos con las formas cutáneas no se hicieron estas determinaciones y no existen informes en la literatura sobre linfocitos formadores de rosetas E totales, activas o estables, en las formas localizadas de la enfermedad (8-10). Desconocemos si los pacientes con esporotricosis poseen en su sangre factores moduladores de la formación de rosetas E, tal como se ha demostrado en pacientes con TBC pulmonar (11, 12). Este trabajo tuvo por objeto el determinar posibles alteraciones en el número de linfocitos formadores de rosetas E y detectar la presencia de factores estimuladores o supresores de rosetas en pacientes con esporotricosis cutánea.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes y controles: Entre marzo de 1981 y febrero de 1986 se seleccionaron en el laboratorio de micología de la facultad de medicina de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia), 21 pacientes mayores de 7 años con esporotricosis cutánea confirmada por el aislamiento del agente etiológico y una intradermorreacción de más de 10 mm con esporotriquina de antígeno polisacárido de fase levadura, o una dilución 1: 1000 (P/V). Los pacientes no estaban recibiendo yoduros u otro tipo de antimicóticos al momento de la evaluación. Como controles se estudiaron 21 voluntarios sanos, mayores de 13 años y sin antece-

Lic. Martha Lucía Escobar; Lic. María E. Medina; Dr. Fernando Montoya: Profesores, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín.

Solicitud de separatas a la Lic. Escobar.

dentes de esporotricosis en el pasado. Tanto los casos como los controles fueron sangrados en ayunas para la obtención de suero y de sangre total.

Separación de linfocitos: Diez mililitros (10 ml) de sangre heparinizada se mezclaron con 100 mg de hierro carbonilo (G AF Corporation, NY) y se incubaron por 30 min. a 37°C, con agitación manual cada 5 min. Después de la incubación la sangre se mezcló con un volumen igual del medio RPMI. 1640. Los linfocitos se aislaron sobre un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (13), se lavaron y ajustaron a una concentración de 2×10^6 células/ml. La viabilidad se determinó con Azul de Tripano y fue siempre mayor del 97%.

Preparación de los glóbulos rojos de carnero: La sangre de carnero fue recolectada en solución de citrato-fosfato-dextrosa (FEU). Los glóbulos se purificaron mediante lavados en solución de NaCl 0.15M y se ajustaron a una concentración final de 0.5% (V/V) con RPMI 1640 suplementado con 30 mM de Hepes, suero bovino fetal al 10% y antibióticos.

Formación de rosetas: Los porcentajes de rosetas E totales, activas y estables, se determinaron tanto con los linfocitos frescos recién aislados, como después de incubarlos con los sueros de los casos o de los controles, según esquema que se describe más adelante.

Las técnicas utilizadas para la determinación de los diferentes tipos de rosetas E, fueron las anteriormente descritas por Aristizábal y García (14). Resumiendo: 0.2 ml de glóbulos rojos de carnero al 0.5% (V/V) se mezclaron con igual volumen de linfocitos a la concentración 2×10^6 células/ml. La mezcla se incubó por 5 min. a temperatura ambiente y se centrifugó luego a 250 X g/5 min. Las rosetas E activas se determinaron inmediatamente después de la centrifugación; las rosetas E totales se contaron después de 1 h de incubación a 4°C y las rosetas E estables, luego de 30 min. a 37°C.

Factores moduladores de formación de rosetas E: Durante 2 horas y a 37°C se incubaron 0.4 ml de linfocitos (2×10^6 células/ml) con igual volumen de suero sin diluir. Los cruces de sueros de casos y controles con los linfoci-

tos respectivos, se hicieron al siguiente esquema: 1. Linfocitos del caso con suero del caso; 2. Linfocitos del caso con suero control; 3. Linfocitos de control con suero del caso; 4. Linfocitos del control con suero del control.

Al término de las 2 h. de incubación, las células se lavaron 2 veces y se resuspendieron en RPMI 1640 con 30 mM de Hepes, suero bovino fetal al 10% y antibióticos. A continuación en cada tubo se determinó el porcentaje de rosetas E totales, activas y estables.

Análisis estadístico: Los resultados son presentados como la media aritmética \pm error estándar de la media (EE). Los análisis de significancia se realizaron con la prueba de T-student para grupos pareados.

RESULTADOS

Todos los pacientes estudiados procedían del Departamento de Antioquia, a saber: 6 del Valle de Aburrá (28,6%) y 15 (71,4%) de otras zonas. Estos últimos en su mayoría eran de áreas rurales y estaban dedicados a la agricultura.

Edad y sexo: Predominó el sexo masculino (76,2%); hubo pacientes desde 8 hasta 67 años pero el mayor número estuvo comprendido en las tres primeras décadas (71,4%) (Tabla 1).

Localización, formas clínicas y evolución de la enfermedad: En el 76% de los casos las lesiones se localizaron en los miembros superiores; la frecuencia de las formas fijas fue similar a la de las linfangíticas (50% de cada una); hubo períodos de evolución desde 20 días hasta 17 años, con una media de 20 meses.

Tabla 1. Edad y sexo en 21 pacientes con esporotricosis.

Grupos de edad	Sexo		Total	
	Masculino	Femenino	No.	%
0-10	1	0	1	4.8
11-20	5	2	7	33.3
21-30	7	0	7	33.3
31-40	2	1	3	14.3
41-50	0	1	1	4.8
51-60	0	0	0	0.0
61 y más	1	1	2	9.5
Total	16 (76.2%)	5 (23.8%)	21	100.0

Linfocitos formadores de rosetas E: No hubo diferencias significativas entre los casos y los controles en cuanto a la formación de rosetas E totales, activas o estables. Los promedios se pueden observar en la Tabla 2. Igualmente, no se observaron diferencias entre los casos con las formas linfangíticas y aquellos con las formas fijas (Tabla 3).

Tabla 2. Linfocitos formadores de rosetas E en casos y controles.

Individuos estudiados	% rosetas E*		
	Total	Activa	Estable
Pacientes	53,8 ± 2,2	32,4 ± 3,2	5,8 ± 1,3
Controles	57,1 ± 2,7	35,3 ± 3,0	5,6 ± 1,1

* Los resultados representan el promedio de los 21 individuos estudiados en cada grupo ± error estándar de la media.

Los promedios de rosetas E totales oscilaron, en general, entre 52% y 57%; los promedios de las activas entre 30% y 35% y los de las estables entre 5,3% y 6,3%. Los anteriores resultados fueron similares a los de los controles normales.

Tabla 3. Linfocitos formadores de rosetas E en casos con las variedades linfangítica y fija de la enfermedad.

Forma clínica	% rosetas E*		
	Total	Activa	Estable
Linfangítica (10)	52,2 ± 2,1	30,4 ± 3,5	5,3 ± 2,0
Fija (11)	55,2 ± 3,7	34,3 ± 5,3	6,3 ± 1,6

* Los resultados representan el promedio de los individuos estudiados en cada grupo ± error estándar de la media.

Factores moduladores de formación de rosetas E: No se obtuvo ningún efecto estimulante o depresor al incubar con los sueros autólogos u homólogos (Tabla 4). El promedio porcentual de rosetas E estables fue mayor con los linfocitos incubados con sueros de pacientes o controles, que con los linfocitos frescos; sin embargo, dichas diferencias no fueron significativas.

Tabla 4. Linfocitos formadores de rosetas E incubadas con sueros autólogos y homólogos de casos y controles.

Tipo de mezcla linfocito-suero	% rosetas E*		
	Total	Activa	Estable
1	49,8 ± 5,0	38,0 ± 4,4	10,4 ± 2,7
2	51,6 ± 4,6	42,6 ± 3,3	10,4 ± 2,3
3	49,8 ± 4,6	37,2 ± 4,6	7,4 ± 2,3
4	51,4 ± 4,0	44,3 ± 3,6	8,3 ± 2,0

* Los resultados representan el promedio de los individuos estudiados en cada grupo ± error estándar de la media.

DISCUSION

La inmunidad mediada por células parece jugar un papel primordial en la resistencia frente a los agentes micóticos (15, 16). La estimación del número de linfocitos T circulantes es uno de los métodos más utilizados en la valoración de dicha inmunidad (8). Los linfocitos T humanos se caracterizan por formar rosetas espontáneas con eritrocitos de carnero (rosetas E) (17). Aquellos linfocitos que poseen receptores de alta afinidad para los eritrocitos pueden identificarse por su capacidad para formar rosetas E activas o estables (18, 19). Estas líneas celulares podrían representar subpoblaciones diferentes de linfocitos T (20). En casos de tuberculosis pulmonar se han podido detectar en los sueros de pacientes, sustancias circulantes que inhiben la formación de rosetas E con los linfocitos de controles normales, así como factores séricos de individuos normales que estimulan la formación de rosetas con los linfocitos de enfermos (11, 12).

Cada uno de los aspectos anteriores se evaluó en la presente investigación y no se encontraron cambios en el número de linfocitos formadores de las distintas rosetas E, ni en la capacidad de formarlas por influencia de posibles factores séricos estimulantes o depresores.

Estos resultados, así como los de Pluoffe et al (7) y los de Meléndez et al (21) demuestran que las poblaciones linfocitarias en sangre periférica de individuos con esporotricosis linfocutánea permanecen inalteradas tanto cuantitativamente como a nivel funcional (respuesta blástica a mitógenos), durante el ataque microbiano y la falla en los mecanismos de resistencia del huésped, que propicia el desarrollo de

la enfermedad, quizá recaiga en otro nivel, tal como lo han demostrado González et al (6) en el sistema fagocítico del individuo enfermo.

SUMMARY

Active and stable E rosette forming lymphocytes from 21 patients with lymphocutaneous sporotrichosis were quantified and compared with a healthy control group. There were no significant differences, between the two groups. Incubation of cells from patients in controls serum and viceversa failed to show any inhibitory effect of the patients sera on rosette formation. Based upon these results the authors suggest that the immune defect in patients with sporotrichosis, if it exists, is not at the T lymphocyte level.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- VELASQUEZ JP, et al. Experiencia de 12 años con la esporotricosis. Polimorfismo clínico de la entidad. *AntioquiaMed* 1976; 26: 153-169.
- 2.- VELEZ H, et al. Esporotricosis. Aspectos clínicos en 78 pacientes. *Acta Med Col* 1984; 9: 146-149.
- 3.- RESTREPO A. Esporotricosis. En: BOTERO D, et al, eds. *Enfermedades Infecciosas. Fundamentos de Medicina Interna*. 2a. ed. Medellín:CIB; 1980: 106-110.
- 4.- WILSON DE, et al. Clinical features of extracutaneous sporotrichosis. *Medicine* 1967; 46: 265-279.
- 5.- LYNCH PJ, et al. Systemic sporotrichosis. *Ann Int Med* 1970; 73: 23-30.
- 6.- GONZALEZ A, et al. Phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes against yeast cells of *Sporothrix Schenckii* in patients with sporotrichosis. *Proceedings of the fifth international conference on the mycosis*. PAHO Scien Publ 1980;396: 308-311.
- 7.- PLUOFFE JF, et al. Cell-mediated immune responses in sporotrichosis. *J Infect Dis* 1979; 139: 152-157.
- 8.- WYBLAN J, FUDENBENG H. Thymus-derived rosette-forming cells in various human disease states: cancer, lymphoma, bacteriae and viral infections, and other diseases. *J Clin Invest* 1971; 52: 1026-1032.
- 9.- MENDES NF, et al. Technical aspects of the rosette tests used to detect human complement receptor (B) and sheep erythrocytes-binding (T) lymphocytes. *J Immunol* 1973; 111: 860-867.
- 10.- JONDAL M, et al. Surface markers on human T and B lymphocytes. 1. A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep red blood cells. *Exp Med* 1972; 136: 207-215.
- 11.- WIEEZOREK Z, et al. Characterization of lymphocyte E rosette inhibitory factor in sera from tuberculosis patients. *Arch Immun Therap Exp* 1977;26:63-68.
- 12.- SKIBINSKI G, et al. Partial characterization of a factor present in normal human and animal serum which stimulate rosette formation by lymphocytes from tuberculous patients. *Arch Immun Therap Exp* 1977; 25: 79-85.
- 13.- BOUYM A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21 (Suppl. 97): 77-78.
- 14.- ARISTIZABAL L, GARCIA LF. The effect of concanavalin A on the formation of different types of E-rosettes. *J Reticuloendothel Soc* 1982;29: 117-125.
- 15.- ARTZ R, JACOBSON R, BULLOCK W. Decreased suppressor cell activity in disseminated granulomatous infections. *Clin Exp Immunol* 1980; 41: 343-345.
- 16.- RESTREPO A, et al. Immune response in paracoccidioidomycosis. A controlled study of 16 patients before and after treatment. *Sabouraudia* 1978; 16: 151-155.
- 17.- JONDAL M. SRBC rosette formation as a human T lymphocyte marker. *Scand J Immunol* 1976; 5 (Suppl 5): 69-71.
- 18.- GALILI V, SCHLESINGER M. The formation of stable E-rosettes by human T lymphocytes activated in mixed lymphocytes reactions. *J Immunol* 1976. 117: 730-732.
- 19.- TRAYCOFF R, et al. The significance of the active E-rosette-forming cell. *Clin Immunol Immunopathol* 1979; 13: 383-385.
- 20.- PARIS SC, GARCIA LF. Evidence that active and stable E-rosette forming cells belong to different human T lymphocyte subpopulations. *Allergol Immunopathol* 1983; 11: 162-168.
- 21.- MELENDEZ C, et al. Perfil inmunológico del paciente con esporotricosis linfocutánea. *Mycopathologia* 1983; 83: 169-173.