

Existencia de lactoferrina en granos de micetoma: estudio de ocho actinomicetomas humanos

Alejandro Palma-Ramos¹
Laura E Castrillón-Rivera¹
Violeta Karen Espinosa-Antúnez¹
Diana Emma Becerril-Parra¹
María del Carmen Padilla-Desgarennes²
María Elisa Vega-Memije³
Roberto Arenas-Guzmán⁴

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

² Laboratorio de Micología, Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua, Secretaría de Salud, México, DF.

³ Servicio de Dermatología.

⁴ Servicio de Micología.

Hospital General Manuel Gea González, Secretaría de Salud, México, DF.

RESUMEN

Antecedentes: el micetoma es un síndrome clínico que consiste en lesiones inflamatorias deformantes y fístulas que afectan los tejidos cutáneo y subcutáneo y el hueso. En México los más frecuentes son los actinomicetomas. De éstos, el de mayor incidencia es por *Nocardia* y de éstos la especie *brasiliensis*; le sigue *Actinomadura madurae*. El actinomicetoma está formado por un grano de bacterias, amalgamado por un polisacárido, rodeado por células polimorfonucleares productoras de enzimas en sus gránulos específicos.

Objetivo: demostrar la existencia de la enzima lactoferrina en granos de pacientes con actinomicetomas.

Material y método: se usaron ocho biopsias de pacientes con diagnóstico de actinomicetoma. Se realizaron dos cortes por biopsia, uno para H-E y el otro para el marcaje de la enzima lactoferrina. Se utilizó el equipo comercial Cell and tissue staining kit goat kit HRP-AEC system (catálogo núm. CTS009) R&D Systems; el anticuerpo primario fue el IgG policlonal anti-lactoferrina humana elaborado de cabra.

Resultados: en los actinomicetomas se encontró lactoferrina, proveniente de polimorfonucleares neutrófilos activados. En el caso de los actinomicetomas por *A. madurae* encontramos 66.6% de alta concentración de lactoferrina en el grano y 33.3% de baja concentración. Al analizar los actinomicetomas producidos por *N. brasiliensis* obtuvimos 60% de alta concentración de lactoferrina en los granos, 20% de concentración moderada y 20% de baja concentración. La lactoferrina se libera dentro del grano del actinomicetoma, al abrirse paso la célula dentro de ellos durante el proceso inflamatorio, liberando el contenido de sus gránulos secundarios (o específicos) directamente al medio, para tratar de eliminar y controlar la infección.

Conclusión: la lactoferrina está presente y adherida en los granos de los actinomicetomas con una concentración alta o considerable de acuerdo con nuestra evaluación, lo que sugiere que ejerce su acción bactericida o bacteriostática al participar como mecanismo de resistencia inmunológica innata en esta afección.

Palabras clave: actinomicetomas, lactoferrina, *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae*.

Recibido: septiembre 2013

Aceptado: noviembre 2013

Correspondencia

Dr. Alejandro Palma Ramos
Departamento de Sistemas Biológicos
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
Calzada del Hueso 1100
04960 México, DF
alpalma@correo.xoc.uam.mx

Este artículo debe citarse como

Palma-Ramos A, Castrillón-Rivera LE, Espinosa-Antúnez VK, Becerril-Parra DE y col. Existencia de lactoferrina en granos de micetoma: estudio de ocho actinomicetomas humanos. Dermatol Rev Mex 2014;58:142-149.

Presence of Lactoferrin in Grains of Mycetoma: A Study of Eight Human Actinomycetomas

ABSTRACT

Background: The mycetoma is a clinical inflammatory syndrome with sinus tracts draining a seropurulent exudates and affecting skin and subcutaneous tissue and bones. In Mexico, actinomycetomas are the most common in 97.9% and eumycetomas only in 2.1%. *Nocardia* has a high incidence with 86.5% of these etiological agents *N. brasiliensis* is the most important one, followed by *Actinomadura madurae* with 10%. Grains in actinomycetoma are composed of bacteria amalgamated by a polysaccharide and surrounded by polymorphonuclear which are producing enzymes in their pellets specific such as collagenase, alkaline phosphatase, lysozyme, and lactoferrin, the latter is important for its bacteriostatic, bactericide and immunomodulatory action.

Objective: To demonstrate the presence of the enzyme lactoferrin in grains of patients with actinomycetomas in humans.

Material and method: Eight biopsies of patients with diagnosis of actinomycetoma from Dermatological Center Dr. Ladislao de la Pascua and General Hospital Dr. Manuel Gea González were done. Two cuts were made by biopsy, one for H-E and the other for the marking of the lactoferrin enzyme. We used the commercial kit Cell and tissue staining kit goat kit HRP-AEC system (catalog no. CTS009) R&D systems, and the primary antibody that was used was the IgG polyclonal anti-human lactoferrin made in goat by Santa Cruz Biotechnology laboratories.

Results: In general the actinomycetomas showed the presence of lactoferrin from activated neutrophil polymorphonuclear. In actinomycetomas by *A. madurae*, we found a 66.6% of high concentration of lactoferrin in the grain, and 33.3% of low concentration. To analyze the actinomycetomas produced by *N. brasiliensis* 60% of high concentration of lactoferrin in the grains, 20% of moderate concentration and 20% of low concentration. Lactoferrin is released within the actinomycetoma grain, on the way the cell inside them during the inflammatory process, releasing the contents of their granules side (or specific) directly to the environment, to try to eliminate and control the infection.

Conclusion: Lactoferrin is present and attached in the grains of the actinomycetomas, with a high or significant concentration according to our assessment, suggesting that it exerts its bactericidal or bacteriostatic action participating as one of the mechanisms of innate immune resistance in this pathology.

Key words: actinomycetom, lactoferrin, *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae*.

El micetoma es un síndrome inflamatorio frecuente en México; afecta la piel y el tejido celular subcutáneo, siguiendo la fascia, el músculo e, incluso, el hueso y los órganos internos. Es causado por actinomicetos (actinomicetoma) o por hongos verdaderos (eumicetoma).^{1,2} En México son más frecuentes los actinomicetomas (97.9%), en relación con los eumicetomas (2.1%). De los actinomicetomas, el más frecuente es *Nocardia* (86.5%); de éstos, la especie *brasiliensis* es la más frecuente, le siguen *Actinomadurea madurae* (10%) y por último, *Streptomyces somaliensis* (1.3%).^{3,4}

Para tratar estas infecciones es importante conocer cómo la inflamación juega tres papeles esenciales: el primero es entregar moléculas efectoras y células al sitio de infección y así aumentar la muerte de los microorganismos invasores por macrófagos; el segundo es proporcionar una barrera física en la forma de microcoagulación vascular para prevenir la diseminación de la infección en el sistema sanguíneo y el tercero es remover el tejido dañado.

Por sus características de duración y células que participan, la inflamación se clasifica en aguda y crónica. La inflamación aguda es un proceso rápido, relativamente corto y caracterizado por la exudación de un fluido y por la migración de leucocitos, inicialmente neutrófilos; mientras que la inflamación crónica se extiende por un periodo prolongado y se asocia con la infiltración de linfocitos y macrófagos, proliferación de vasos sanguíneos y fibrosis. La inflamación se termina cuando el invasor es eliminado y los mediadores secretados son removidos; sin embargo, muchos factores modifican el curso y apariencia morfológica, así como el patrón de terminación y duración de ésta.^{5,6}

Los leucocitos polimorfonucleares contribuyen en el sistema de inmunidad inespecífica por

su movilidad, su capacidad para ingerir partículas (fagocitosis) y destruirlas. Esta última propiedad es dependiente de los productos de su metabolismo oxidativo, pero también está mediada por proteínas de sus gránulos.⁷ Bainton en 1975 mencionó que en gránulos específicos de polimorfonucleares de conejo, se encontró colagenasa, fosfatasa alcalina, lisozima y lactoferrina, mientras que los gránulos azurófilos contienen mieloperoxidasa, hidrolasas ácidas, proteínas catiónicas y lisozima.⁸⁻¹⁰

La lactoferrina es una glucoproteína monomérica no hémica que se une con el hierro; es sintetizada por neutrófilos y células acinares epiteliales.¹¹ Esta proteína fue detectada en muchas de las secreciones provenientes de las superficies de las mucosas humanas.¹² Estudios *in vitro* mostraron que la lactoferrina es capaz de exhibir actividad antimicrobiana sobre un amplio espectro de agentes patógenos, entre los que se incluyen: bacterias, levaduras, hongos, protozoarios y virus.¹³

El efecto bacteriostático relativo a la inhibición de la multiplicación bacteriana está relacionado con su capacidad para captar Fe^{3+} (ion férrico), que es esencial para el crecimiento y expresión de la virulencia de algunos agentes patógenos. El efecto bactericida radica en la capacidad de la lactoferrina de interactuar con cationes divalentes, como Ca^{2+} , que contribuyen a estabilizar la superficie bacteriana, y con componentes bacterianos con carga negativa, como el lipopolisacárido. Esta interacción desorganiza y desestabiliza la superficie celular, causa la pérdida de la permeabilidad y, finalmente, la muerte celular.¹²⁻¹⁴

A nivel sistémico y local, la lactoferrina modula *in vivo* la función de los componentes humores y celulares de la respuesta innata, como neutrófilos, células asesinas naturales, linfocitos T γ/δ , interferón α y β e interleucina 18, y adap-

tativa, a través de anticuerpos, interleucinas y linfocitos Th1/Th2 y B. La acción reguladora de la lactoferrina despertó un creciente interés en el área clínica por sus potenciales aplicaciones profilácticas y terapéuticas para el control de infecciones.¹²

El objetivo de este artículo es demostrar la existencia de la enzima lactoferrina en granos de actinomicetomas de pacientes humanos.

MATERIAL Y MÉTODO

Biopsias

Se estudiaron ocho biopsias de pacientes con actinomicetomas por *N. brasiliensis* (cinco) y por *A. madurae* (tres), diagnosticados en el Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua y en el Hospital General Dr. Manuel Gea González, de la Secretaría de Salud del Distrito Federal, México. Se les realizaron dos cortes, uno para la técnica de H-E y el otro para el estudio inmunohistológico.

Hematoxilina-eosina

Desparafrinar, teñir con hematoxilina de Harris durante un minuto y lavar. Diferenciar con alcohol ácido, lavar y virar con agua amoniacal, lavar otra vez y teñir con eosina durante 30 segundos, deshidratar y montar. Se observan núcleos azules y citoplasma en color rosa o naranja.¹⁵

Inmunohistología

Para el marcaje de la enzima lactoferrina se utilizó el equipo comercial Cell and tissue staining kit goat Kit HRP-AEC System (catálogo núm. CTS009) R&D Systems y el anticuerpo primario fue el IgG policlonal anti-lactoferrina humana, elaborado de cabra, con una concentración de 200 µg/mL, producido por los laboratorios Santa Cruz Biotechnology.

RESULTADOS

Las Figuras 1 a 16 son producto del marcaje inmunohistológico con IgG anti-lactoferrina humana en ocho pacientes con actinomicetoma: tres pacientes por *Actinomadura madurae* y cinco por *Nocardia brasiliensis*. Se realizó una valoración de acuerdo con la existencia de lactoferrina con el criterio siguiente: si la concentración de la lactoferrina fue alta (+++); cuando la concentración fue moderada (++); cuando la concentración fue baja (+) y sin lactoferrina (-).

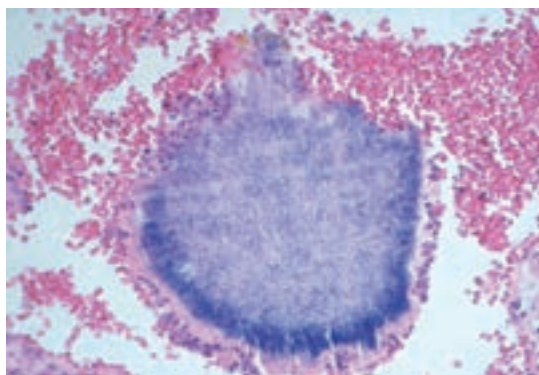


Figura 1. Grano de *A. madurae* teñido con hematoxilina-eosina. Paciente 1.

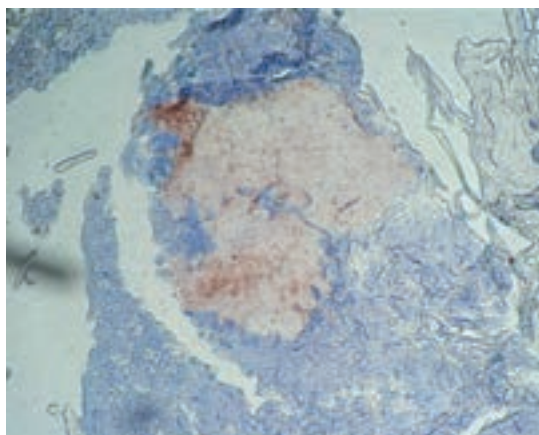


Figura 2. Grano de *A. madurae* marcado con anti-lactoferrina humana (+). Paciente 1.

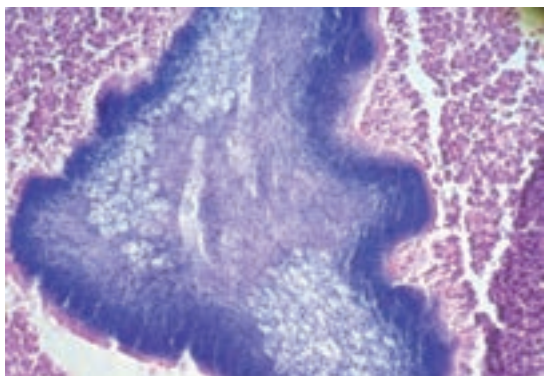


Figura 3. Grano de *A. madurae* teñido con hematoxilina-eosina. Paciente 2.

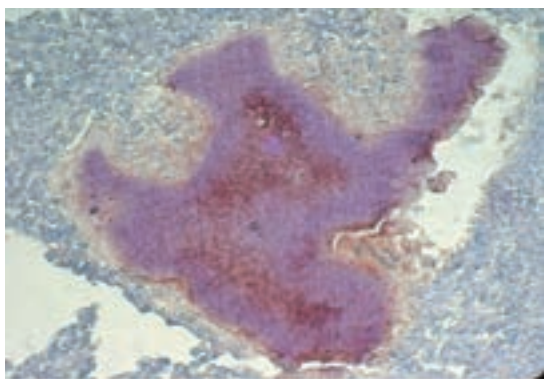


Figura 4. Grano de *A. madurae* marcado con anti-lactoferrina humana (+). Paciente 2.

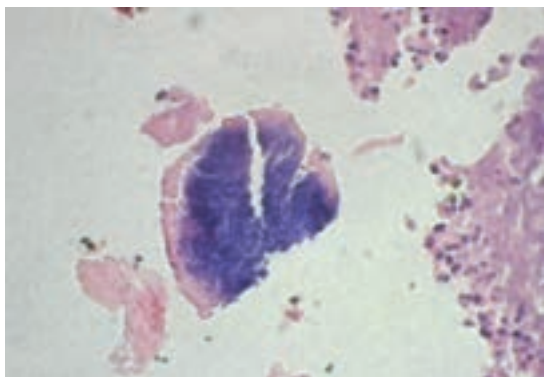


Figura 5. Grano de *A. madurae* teñido con hematoxilina-eosina. Paciente 3.

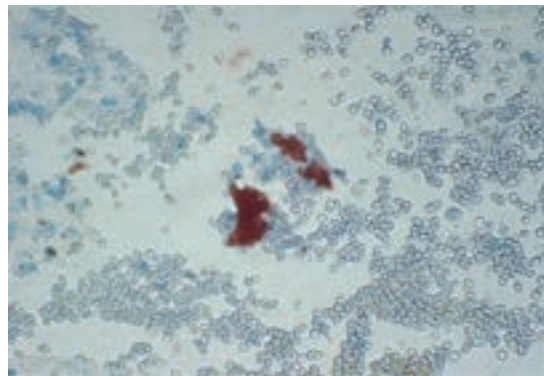


Figura 6. Grano de *A. madurae* marcado con anti-lactoferrina humana (+). Paciente 3.

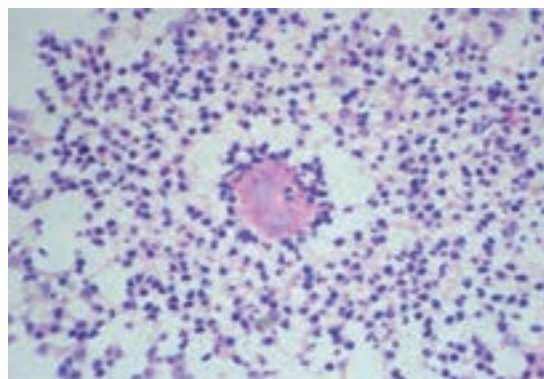


Figura 7. Grano de *N. brasiliensis* teñido con hematoxilina-eosina. Paciente 4.

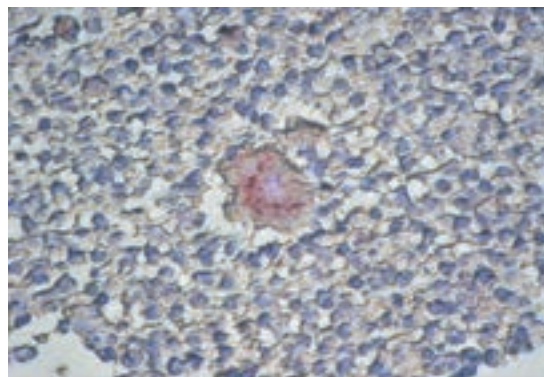


Figura 8. Grano de *N. brasiliensis* marcado con anti-lactoferrina humana (+). Paciente 4.

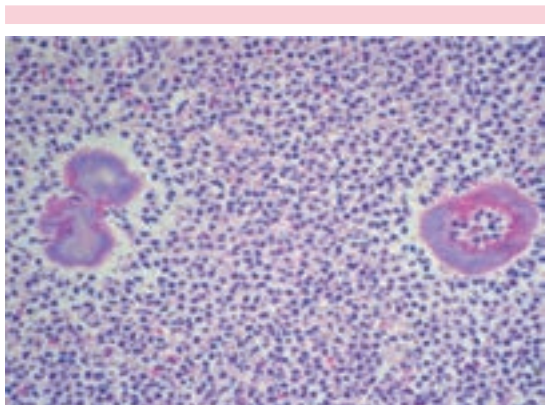


Figura 9. Grano de *N. brasiliensis* teñido con hematoxilina-eosina. Paciente 4.

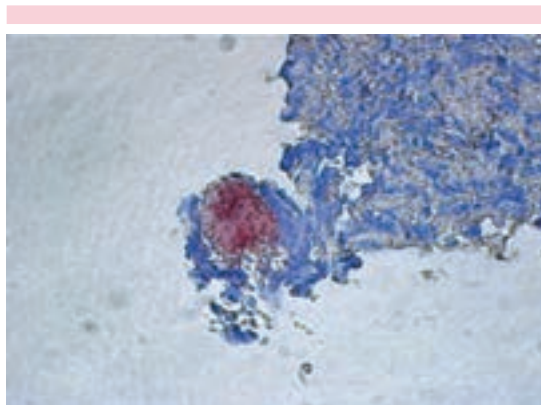


Figura 12. Grano de *N. brasiliensis* marcado con anti-lactoferrina humana (+). Paciente 6.

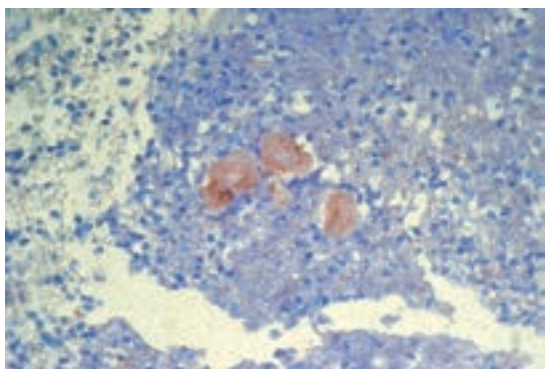


Figura 10. Grano de *N. brasiliensis* marcado con anti-lactoferrina humana (+). Paciente 5.

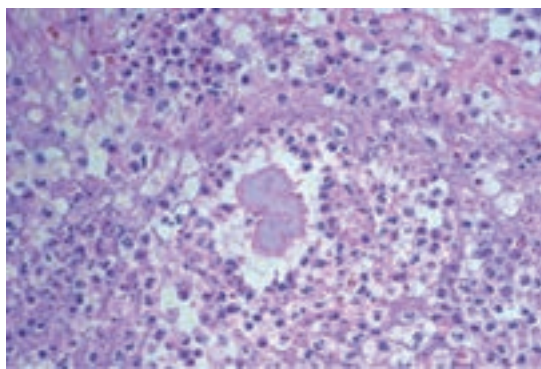


Figura 13. Grano de *N. brasiliensis* teñido con hematoxilina-eosina. Paciente 7.

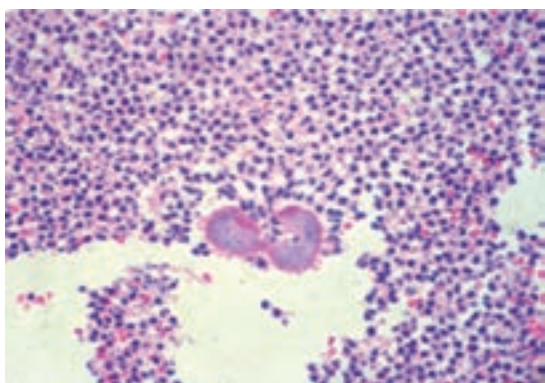


Figura 11. Grano de *N. brasiliensis* teñido con hematoxilina-eosina. Paciente 6.

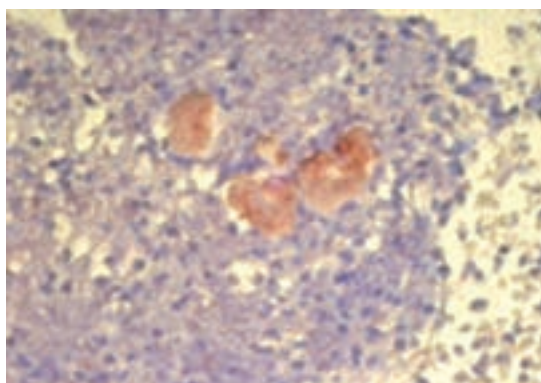


Figura 14. Grano de *N. brasiliensis* marcado con anti-lactoferrina humana (+). Paciente 7.

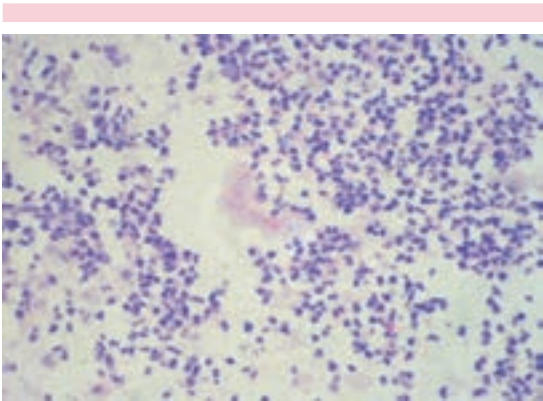


Figura 15. Grano de *N. brasiliensis* teñido con hematoxilina-eosina. Paciente 8.

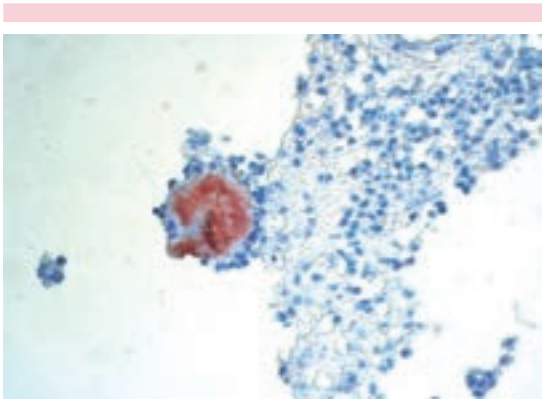


Figura 16. Grano de *N. brasiliensis* marcado con anti-lactoferrina humana (+). Paciente 8.

Los resultados obtenidos en la búsqueda de la lactoferrina en las lesiones de pacientes con diagnóstico de actinomicetoma se resumen en el Cuadro 1.

DISCUSIÓN

La lactoferrina tiene efecto bactericida (frena la proliferación de hongos y virus), bacteriostático y antifúngico (liga iones de hierro, privando de un nutriente esencial a las bacterias e inhibiendo su crecimiento), antiviral (se une a la partícula viral, impidiendo que se adhiera a la célula hospedera)¹⁶ e inmunomodulador (modula la

inflamación por inhibición de la migración de células de Langerhans).¹⁷ Por lo descrito anteriormente, nos interesó el estudio de la lactoferrina en los actinomicetomas, ya que ésta es sintetizada y almacenada en los gránulos específicos de los neutrófilos polimorfonucleares y, en el caso particular de los actinomicetomas, son las células con mayor abundancia que rodean al grano y en ocasiones llegan a penetrarlo, por lo que se esperaba encontrarla en las biopsias de pacientes con actinomicetomas por *A. madurae* y *N. brasiliensis*, que son los más frecuentes en nuestro país.

Cuadro 1. Existencia de lactoferrina en pacientes con diagnóstico de actinomicetoma (expresada en porcentajes)

Paciente	Existencia de lactoferrina	% de lactoferrina
Actinomicetoma por <i>Actinomadura madurae</i>		
1	(+)	33.3
2	(+++)	66.6
3	(+++)	
Actinomicetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i>		
4	(+)	20
5	(++)	20
6	(+++)	60
7	(+++)	
8	(+++)	

De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio inmunohistológico realizado a ocho biopsias de pacientes con diagnóstico de actinomicetoma en los servicios de Dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González y de Micología del Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua, se encontró la enzima lactoferrina en todos los casos estudiados, aunque en diferentes concentraciones (Cuadro 1). Con esta evaluación se pudo tener una relación semicuantitativa expresada en porcentajes, que en general mostró que los actinomicetomas tienen 100% de existencia de lactoferrina, proveniente del polimorfonuclear neutrófilo activado. En el caso de los actinomicetomas por *A. madurae*,

encontramos 66.6% de alta concentración de lactoferrina en el grano y 33.3% de baja concentración. Al analizar los actinomicetomas producidos por *N. brasiliensis* obtuvimos 60% de alta concentración de lactoferrina en los granos, 20% de concentración moderada y 20% de baja concentración.

Al analizar los resultados anteriores podemos observar en las Figuras 1 a 16 que la lactoferrina es liberada por los polimorfonucleares neutrófilos activados dentro del grano de los actinomicetomas, al abrirse paso dentro de ellos durante el proceso inflamatorio y liberar el contenido de sus gránulos secundarios (o específicos) directamente al medio para tratar de eliminar y controlar la infección.

CONCLUSIÓN

La lactoferrina está presente y adherida en los granos de los actinomicetomas, con una concentración alta o considerable, de acuerdo con nuestra evaluación, lo que sugiere que ejerce su acción bactericida o bacteriostática participando como uno de los mecanismos de resistencia inmunológica innata en esta enfermedad.

REFERENCIAS

1. Castrillón Rivera LE, Palma Ramos A, Padilla Desgarenes C. La función inmunológica de la piel. *Dermatol Rev Mex* 2008;52:211-224.
2. Arenas R. *Micología médica ilustrada*. 4ª ed. México: McGraw-Hill, 2011;125-146.
3. Palma RA, Castrillón RL, Encinas PM, Padilla DC y col. Participación de los queratinocitos en la respuesta inmunitaria contra actinomicetomas. *Dermatol Rev Mex* 2009;53:225-233.
4. Padilla C, Novales J, Juárez V, Flores A. Minimicetoma. Presentación de un caso. *Rev Cent Dermatol Pascua* 2004;13:41-44.
5. Kantarci A, Van Dyke TE. Resolution of inflammation in periodontitis. *J Periodontol* 2005;76:2168-2174.
6. Barker JN, Mitra RS, Griffiths CE, Dixit VM, et al. Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet* 1991;337:211-214.
7. Manfred G, Speer CP, Bernd D, Sawatzki G. Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Leuk Biol* 1991;49:427-433.
8. Baiton DF. Sequential degranulation of the two types of polymorphonuclear leukocyte granules during phagocytosis of microorganisms. *J Cell Biol* 1973;58:249.
9. Baiton DF. Neutrophil granules (annotation). *Br J Haematol* 1975;29:17.
10. Bullen JJ, Armstrong JA. The role of lactoferrin in the bacterial function of polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 1979;36:781-791.
11. Arnold RR, Brewer M, Gauthier JJ. Bactericidal activity of human lactoferrin: Sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect Immun* 1980;28:893-898.
12. Drago SE, Flores RL, Oliver AG, Adriana JL y col. La lactoferrina como modulador de la respuesta inmunitaria. *Bioquímica* 2008;33:71-82.
13. Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals* 2004;17:189-196.
14. Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* 1992;56:395-411.
15. Cormack HD. La histología y sus métodos de estudio. *Histología de HAM* 1987:1-28.
16. Brock JH. The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol* 2002;80:1-6.
17. Griffiths CE, Cumberbatch M, Tucker SC, Dearman RJ, et al. Exogenous topical lactoferrin inhibits allergen-induced Langerhans cell migration and cutaneous inflammation in humans. *Br J Dermatol* 2001;144:715-725.