

Artículo original

Demostración de la participación de la respuesta inmunitaria celular adquirida (TCD4⁺ h1) contra el eumicetoma

Alejandro Palma Ramos,* Violeta Karen Espinosa Antúnez,* Laura Estela Castrillón Rivera,* Diana Emma Becerril Parra,* Paulina Camacho Oliva,* María Elisa Vega Memije,** Roberto Arenas Guzmán,*** María Guadalupe Chávez López****

RESUMEN

Antecedentes: se ha observado que en los actinomictomas no hay presentación de antígeno; es decir, se carece de activación de linfocitos T_{CD4⁺H1} y, por ende, no hay secreción de INF- γ y, por lo tanto, la producción de citocinas proinflamatorias se realiza por medio de la vía de activación de queratinocitos.

Objetivo: demostrar la participación de la respuesta inmunológica celular adquirida en linfocitos T_{CD4⁺H1} productores de INF- γ (activación) en cortes histológicos de pacientes con diagnóstico de eumicetoma.

Material y método: estudio retrospectivo efectuado en siete biopsias de pacientes con diagnóstico de eumicetoma. Se analizaron tres cortes por cada paciente con el uso de hematoxilina-eosina, anti-CD4⁺ humana FITC, anti-CD8⁺ humana R- ficoeritrina y anti-INF- γ humano (avidin-biotina).

Resultados: se encontraron linfocitos T_{CD4⁺H1} en todos los eumicetomas estudiados.

Conclusiones: a diferencia del actinomictoma en el eumicetoma se encontraron linfocitos T_{CD4⁺H1} productores de INF γ , con lo que por medio de esta citocina se da la activación de los macrófagos para la secreción de TNF α e IL-1 β en la reacción inflamatoria de este síndrome.

Palabras clave: eumicetoma, INF- γ , linfocitos T_{CD4⁺H1},

ABSTRACT

Background: The mycetoma is a chronic syndrome, granulomatous, subcutaneous and inflammatory disease caused by several species of true filamentous fungi (eumycetoma) or filamentous bacteria (actinomycetoma). The syndrome is characterized by a volume increase, deformation of the area and multiples nodules, that suppurate and drain serous or purulent exudates, in which the parasite is forming grains. These causative agents are usually present in the soil and they enter in to the subcutaneous tissue through traumatic inoculation. In the actinomycetoma has been observed there is not a performance of the antigen presentation and there is not lymphocytes T_{CD4⁺H1} activation either, therefore there is not presence of the secretion of INF- γ . And the presence of pro-inflammatory cytokines is being carried out through the activation of keratinocytes.

Objectives: Demonstrate the participation of the acquired immune response with the presence of Lymphocytes T_{CD4⁺H1} producers of the INF- γ (activation), in a histological section of patients diagnosed with eumycetoma.

Methods: Seven biopsies of patients with diagnosis of eumycetoma were analyzed (three slides from each patient), and stained with Hematoxylin- Eosin, anti-CD4⁺ human (FITC), anti-CD8⁺ human (RE) and anti-INF- γ human (Avidin-Biotin).

Results: The presence of T_{CD4⁺H1} lymphocytes and INF γ was found in all studied eumicetomas.

Conclusions: Unlike of actinomycetoma, in the eumycetoma was found the presence of Lymphocytes T_{CD4⁺H1} INF- γ producers. Thus through this cytokine is carried out the macrophages activation for the secretion of TNF α and IL-1 β (pro-inflammatory cytokines), in the inflammatory reaction of this syndrome.

Key words: Eumycetoma, INF- γ , Lymphocytes T_{CD4⁺H1},

* Profesor investigador del Laboratorio de Inmunobiología. Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

** Servicio de Dermatología del Hospital General Manuel Gea González, Secretaría de Salud.

*** Servicio de Micología del Hospital General Manuel Gea González, Secretaría de Salud.

**** Servicio de Dermatología y Micología del Hospital General de Acapulco, Secretaría de Salud.

Biológicas y de la Salud. Departamento de Sistemas Biológicos. Avenida Del Hueso 1100, colonia Villa Quietud, México 04960 DF. Correo electrónico: alpalma@correo.xoc.uam.mx
Recibido: 6 de diciembre 2011. Aceptado: 10 de enero 2012.

Este artículo debe citarse como: Palma-Ramos A, Espinosa-Antúnez VK, Castrillón-Rivera LE, Becerril-Parra DE, y col. Demostración de la participación de la respuesta inmunitaria celular adquirida (TCD4⁺ h1) contra el eumicetoma. Dermatol Rev Mex 2012;56(2):102-108.

El eumicetoma es un síndrome crónico, subcutáneo, en el que el agente etiológico forma un grano micelial más o menos compacto. La respuesta inmunitaria se caracteriza por una importante necrosis local granulomatosa y fistulas. Es endémico en zonas calientes y áridas con lluvias limitadas. Es común en Somalia meridional, Senegal, India, Argentina y Sudán.¹ En México, los eumicetomas ocupan 2% de los casos de micetomas y el agente causal más común es *Madurella mycetomatis*.² El microorganismo coexiste en el suelo y puede penetrar el tejido subcutáneo por una inoculación traumática. Los micetomas son más frecuentes en hombres de 20 a 40 años de edad, y son los pies los más comúnmente afectados. En el micetoma aparecen múltiples nódulos por los que drena un líquido filante que contiene los granos durante la fase activa de la enfermedad. El estudio histológico describe tres tipos de reacciones: en el primer tipo los granos están rodeados por una capa de polimorfonucleares, seguido por un área de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. En el segundo tipo de reacción, los neutrófilos tienden a desaparecer y son sustituidos por los macrófagos y células gigantes multinucleadas. En el tercer tipo hay un granuloma epitelioides bien organizado, con células gigantes de Langhans's.³ A diferencia del actinomicetoma, en el que no hay presentación de antígeno por las células dendríticas porque los granos en este síndrome están formados por acumulaciones de bacterias y exopolisacáridos (en el caso de granos por *A. madurae* son polisacáridos ácidos sulfatados y en los granos por *Nocardia* son polisacáridos neutros)⁴ que impiden la salida de péptidos bacterianos y, de esta manera, no son ingeridos por células dendríticas para su posterior presentación. De esta manera evitan la activación de linfocitos en los ganglios linfáticos.⁵

En eumicetomas no se ha encontrado el cemento de unión y sólo contienen hifas entrelazadas que forman el grano, lo que permite la salida de péptidos del hongo que luego son atrapados por las células dendríticas y, posteriormente, son presentados a los linfocitos (CD4⁺ TH1) que viajarán al sitio de la lesión para secretar INF- γ y activar a los macrófagos para la producción de TNF α , e IL-1 β . De esta forma atraen y activan polimorfonucleares que se pegan a la superficie del grano y a veces causan su fragmentación⁶ en la zona de infección.

Con el uso de técnicas de inmunohistoquímica se demostró que en los eumicetomas hay tres zonas de reacción:

primero la que rodea el grano y dio positiva con el anti-CD15 (neutrófilos). Segundo, la positiva para el anti-CD68 (macrófagos) y anti-CD3 (T linfocitos). Tercero la que esencialmente contiene linfocitos B.

En la superficie y filamentos que rodean el grano se demostró la existencia de IgG e IgM y complemento.⁷ Los linfocitos T cooperadores específicos del antígeno pueden dividirse en dos tipos: TH1 y TH2 de acuerdo con su producción de citocinas y su función. Los linfocitos TH1 se caracterizan por producir, preferentemente, IL-2, INF- γ y linfoxina, y son estimuladas por la IL-12. Los linfocitos TH2 producen, preferentemente, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, y dependen de la IL-4. El representante de las citocinas de Th1 es el INF γ , que es inhibidor del crecimiento de las células TH2.⁸ Es importante recordar que la INF γ se produce, principalmente, por: linfocitos CD4⁺ TH1, linfocitos CD8⁺ (citotóxicos) y células NK. Su producción está controlada por citocinas secretadas por las células presentadoras, como IL-12 y IL-18. Uno de los efectos más importantes del INF- γ es en los macrófagos, lo que permite aumentar su capacidad de matar y destruir a los microorganismos fagocitados.

El objetivo de este estudio es demostrar la existencia de linfocitos T_{CD4+} H1, y su activación por el INF- γ en eumicetomas humanos.

MATERIAL Y MÉTODO

Biopsias. El Departamento de Dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González proporcionó siete biopsias de pacientes con diagnóstico de eumicetoma. Se efectuaron tres cortes de cada biopsia que se tiñeron con hematoxilina-eosina, anti-CD4⁺ humana FITC, anti-CD8⁺ humana R- ficoeritrina y anti-INF γ humano (Avidin-biotina).

Técnica histológica: Ddesparafinar: xilol 10 minutos. Xilol-alcohol abs. 5 minutos, alcohol absoluto 5 minutos, alcohol 96 %, 5 minutos, alcohol 70 %, 5 minutos, agua destilada 5 minutos.

Hematoxilina-eosina:¹⁰ teñir con hematoxilina de Harris durante un minuto, lavar, diferenciar con alcohol-ácido, lavar y colocar en agua amoniacal; lavar nuevamente y colorear con eosina durante 30 segundos, deshidratar y montar. Los núcleos se ven de color azul y el citoplasma de color rosa o naranja.

Immunohistoquímica

Marcaje con fluorescencia;¹¹ agregar PBS (7.4) 5 minutos, bloquear con PBS-gelatina (0.025%) 5 minutos, colocar el anticuerpo monoclonal anti-CD4⁺ humano fluoresceína (FITC) (laboratorios CALTG) y anti-CD8⁺ humano con R - ficoeritrina (Biolegend) diluidos 1/100 en la solución de fosfatos-gelatina (PBS-G). Incubar durante dos horas a temperatura ambiente en cámara húmeda y en la oscuridad. Lavar con PBS. Colocar una gota de glicerol-PBS (9: 1). Observar en el microscopio de fluorescencia.

Histoquímica

Para marcar el INF γ se utilizó el equipo comercial Cell and Tissue staining kit[®] R & D Systems HRP-AEC SYSTEM anti-goat (catalogue CTS009) (Avidin-biotin and 3.3, diaminobenzidín), proyectado para la ubicación de los antígenos en un rango de amplio espectro de muestras histológicas y citológicas. Anticuerpo; IgG policlonales anti-INF γ humano producido en cabra por biotecnología de Santa Cruz.

RESULTADOS

En el Departamento de Dermatología y Micología del Hospital General Manuel Gea González se estudiaron siete pacientes con diagnóstico de eumicetoma. A cada biopsia se le practicaron tres cortes: uno para el diagnóstico con tinción de hematoxilina eosina, otro para el marcaje con anticuerpos monoclonales anti-CD4⁺ humanos con fluoresceína (FITC) y con anti-CD8⁺ humana R-ficoeritrina. Se observaron con lámpara de argón 50W y longitud de onda de 530 nm (FITC), 585 nm (PE) en fluorescencia. Al tercer corte se le hizo reacción con IgG policlonal anti-INF γ humano producida en cabra y el equipo comercial Cell and Tissue staining kit R & D Systems HRP-AEC SYSTEM anti-goat (catalogue CTS009) (Avidin-biotin and 3.3, diaminobenzidín). Las imágenes se observaron a 40 X y se muestran en las Figuras 1 a 7.

Los resultados de los estudios mostrados se resumen en el Cuadro 1, en donde se relaciona el grano del eumicetoma con células CD 4⁺ o CD 8⁺ y el INF γ .

DISCUSION

De acuerdo con los tipos de reacciones descritos por Fahal en eumicetomas⁷ hay participación activa de polimorfo-

nucleares y macrófagos que rodean los granos, y una capa ligeramente más distante, que son los linfocitos, como se muestra en el estudio de la fluorescencia (Figura 8) en donde casi 100% de los linfocitos en los eumicetomas estudiados son células T CD4⁺ y prácticamente no se han encontrado T CD8⁺. Es fácil de entender que las células T CD4⁺ se activan mediante la presentación de antígeno efectuada por las células dendríticas en los ganglios linfáticos y con ellas la IL-12, para que las células T maduren a linfocitos TH1 (productores de INF- γ) en el ganglio linfático y a través de la sangre alcancen el sitio de la infección y ahí secreten el INF- γ para estimular y activar a los macrófagos que se encuentran en el tejido y mejorar la fagocitosis mediante el incremento de la producción de óxido nítrico y, por lo tanto, destruir al agresor del organismo.

Los macrófagos activados atraen y activan células polimorfonucleares y neutrófilos mediante la secreción de TNF- α . Los linfocitos T CD8⁺ son activados por células presentadoras que han sintetizado el péptido en sus organelos o éste se encuentra en su citoplasma. Estos antígenos se conocen como de origen intracitoplásmico. Durante la respuesta inmunitaria innata y adquirida los macrófagos responden a diferentes productos celulares, el más importante de estos es el INF- γ . La estimulación de los macrófagos con INF- γ aumenta la actividad antimicrobiana y antitumoral, y regula el proceso de presentación de antígeno por diferentes rutas. Las células productoras INF- γ son los linfocitos TCD4⁺ (TH1), T CD8⁺ y las células NK. La producción del INF- γ está controlada por citocinas secretadas por las células presentadoras de antígeno; las más importantes son: la IL-12 y la IL-18.⁹

Este estudio es importante si se tiene en cuenta que una de las diferencias entre actinomictomas y eumicetomas (independientemente de que los primeros son causadas por bacterias y los segundos por hongos) es un cemento de unión compuesto de polisacáridos que fusionan las bacterias en el actinomictoma (que en el caso de actinomictomas por *Actinomyces madurae* es un polisacárido ácido sulfatado y en los actinomictomas por *Nocardia brasiliensis* es un polisacárido neutro)¹² y son los responsables de evitar que los péptidos secretados por los microorganismos que forman el grano no sean fagocitados o endocitados por las células responsables de la presentación de antígeno y así evitar la activación de los linfocitos en los ganglios linfáticos. Esto ocasiona que no

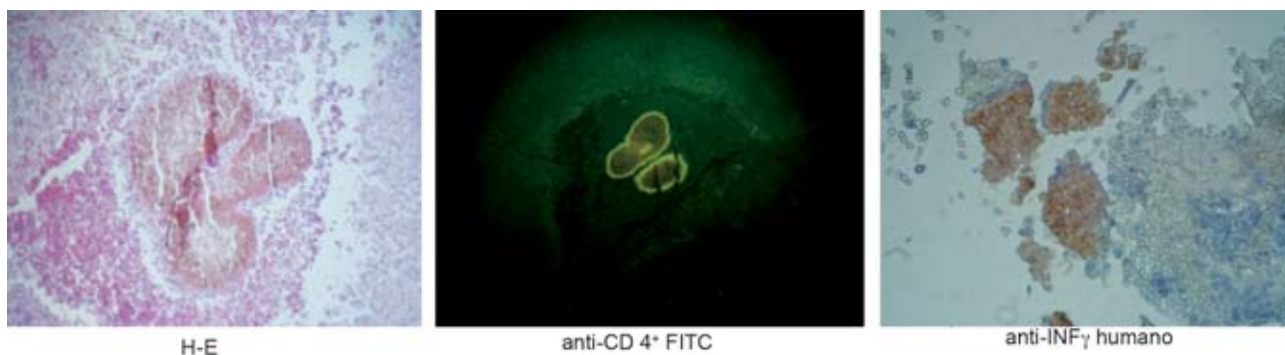


Figura 1. Paciente 1 (grano negro). *Madurella mycetomatis*.

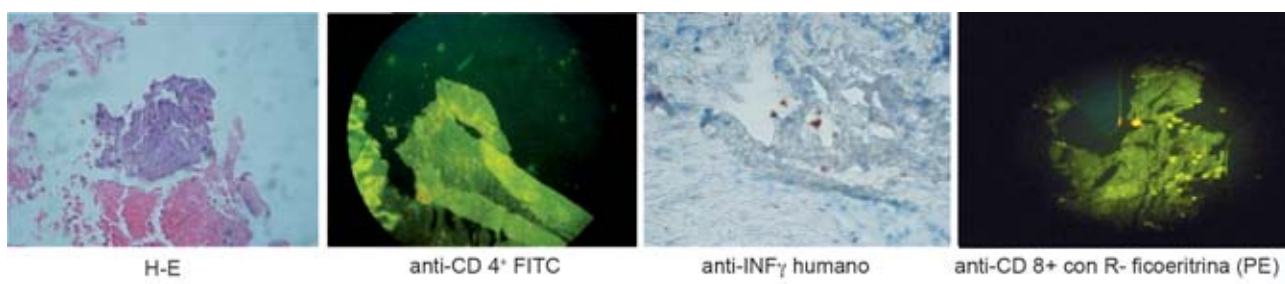


Figura 2. Paciente 2 (grano negro).

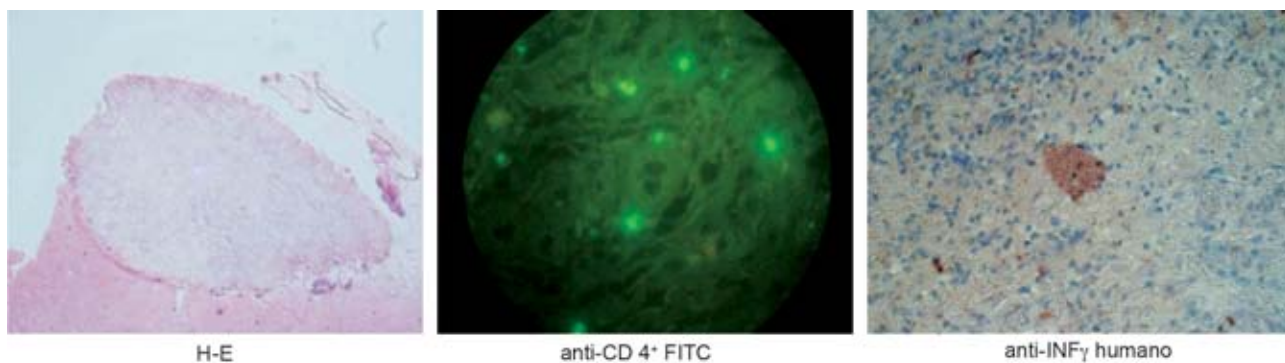


Figura 3. Paciente 3 (grano blanco). *Acremonium*.

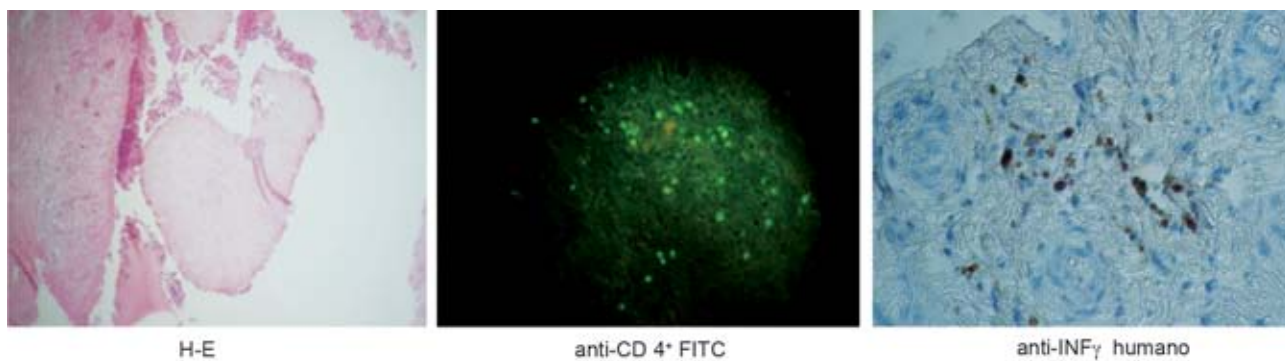


Figura 4. Paciente 4 (grano blanco).

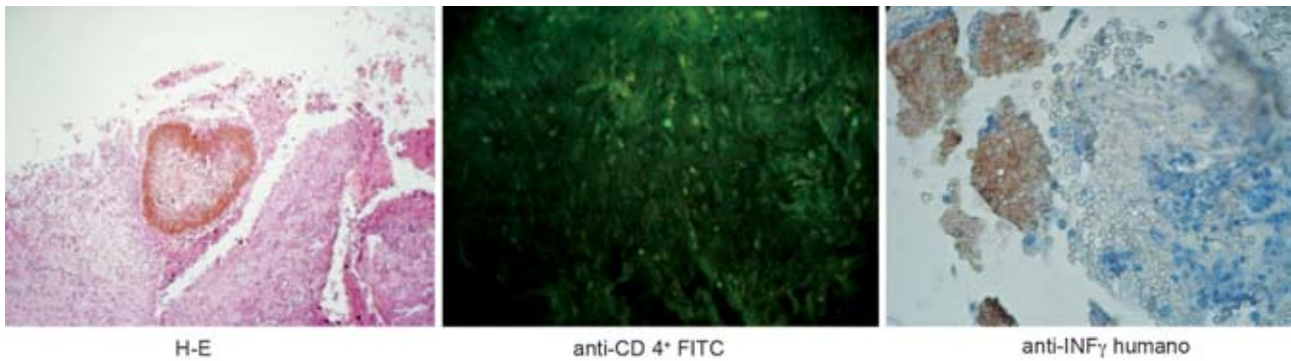


Figura 5. Paciente 5 (grano negro) *Madurella*.

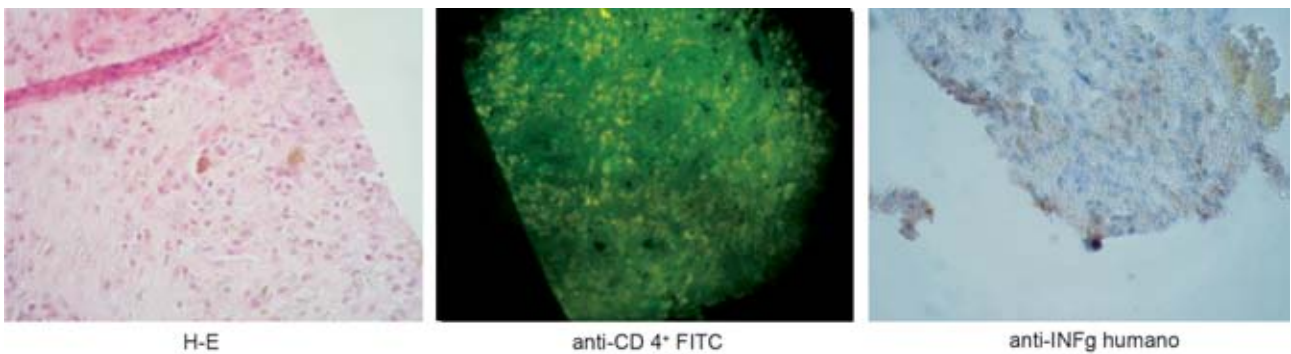


Figura 6. Paciente 6 (grano blanco).

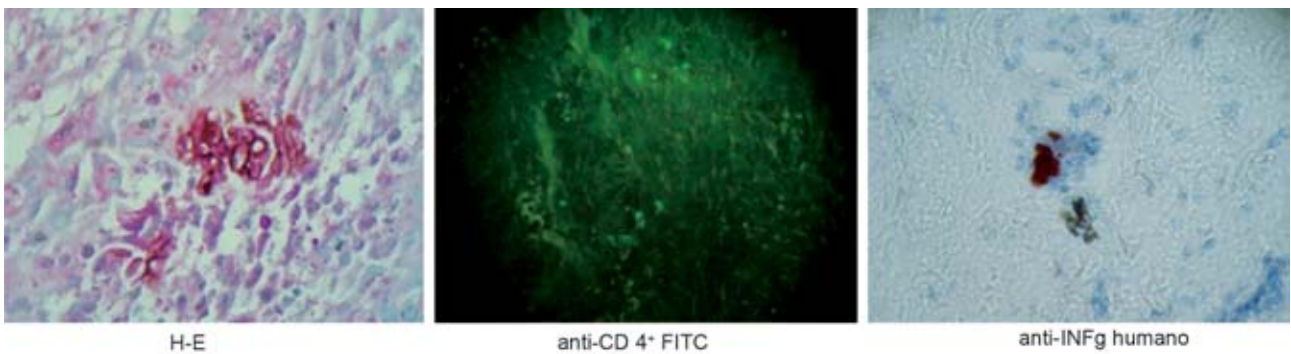


Figura 7. Paciente 7 (grano blanco).

haya participación de linfocitos TH1 en la lesión, y no hay participación del INF- γ . Por lo tanto, no hay participación del TNF α por esta vía. La existencia de estas moléculas en la lesión y de la IL-1 β se debe a la activación de los queratinocitos de la piel que se activan por la presencia de los patrones moleculares asociados con patógenos (PAMPs), que son reconocidos por los receptores tipo Toll en los queratinocitos (TLRs).¹³ Coexisten en estas células

desde el TLR1 al TLR9, con especial atención en los TLR4 y TLR2/TLR6 que se unen a lipopolisacáridos, contra hongos, bacterias gram positivas y otros patógenos.¹⁴

En el caso del eumicetoma se describen tres tipos de reacción en los tejidos: la tipo I se caracteriza por la adherencia de neutrófilos a la superficie del grano, destacando su desintegración. En el segundo tipo de reacción, los neutrófilos tienden a desaparecer y son sustituidos

Cuadro 1: Relación entre el tipo del grano en eumicetomas con la presencia de linfocitos T CD 4⁺, T CD 8⁺ e INF γ .

Paciente	Grano	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺	Presencia de INF γ
1	Grano negro (<i>Madurella mycetomatis</i>)	100	-	+++
2	Grano negro	99	1	+++
3	Grano blanco (<i>Acremonium</i>)	100	-	+++
4	Grano Blanco	100	-	+++
5	Grano negro (<i>Madurella</i>)	100	-	+++
6	Grano blanco	100	-	+++
7	Grano blanco	100	-	+++

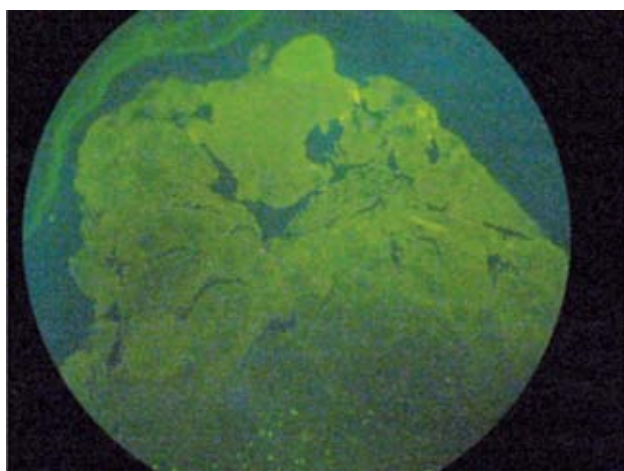


Figura 8. Eumicetoma por *Acremonium* con linfocitos T CD4⁺ productores de INF γ cerca de los vasos sanguíneos circundantes con la infección.

por los macrófagos y células gigantes multinucleadas. En el tipo III se forma un granuloma epiteloide y células de Langhans. Es común encontrar estos tres tipos de reacciones en diferentes combinaciones, la más común es con I, II, y III.

En la reacción de tejido contra el grano hay una zona de neutrófilos estrechamente asociada con el grano y el tejido de granulación que contiene los histiocitos, seguidos por una zona de linfocitos, células plasmáticas, células gigantes y fibroblastos más hacia la periferia.¹⁵ Los linfocitos en la periferia son los que se caracterizaron en este estudio, tomando siete diferentes eumicetomas, tres de granos negros y cuatro de granos blancos. En todos los casos se marcó con anti-CD4⁺ (FITC) y anti-CD8⁺ R- ficoeritrina

(PE) observados en fluorescencia. En todos se encontró una marca de casi 100% de linfocitos T CD4⁺. Cuando se marcó en busca de la INF γ con IgG policlonales humano anti-INF γ producida en cabra con un equipo comercial de células y tejidos (R & D Systems, anti-goat. Avidin-biotina y 3.3, diaminobenzidín) se encontró INF γ en todas las muestras analizadas, lo que explica la activación de los macrófagos y la presencia de la TNF α e IL-1 β , responsable de la activación de los neutrófilos que se encargan del ataque a los granos del eumicetoma secretando enzimas como la lactoferrina, la β -glucuronidasa y la lisozima.

CONCLUSION

A diferencia del actinomycetoma, en el eumicetoma sí se encontraron linfocitos T CD4⁺ y de INF γ , con la consiguiente activación de los macrófagos y la secreción de TNF α e IL-1 β en la reacción inflamatoria que rodea al grano.

REFERENCIAS

- Ahmed R, Adelman D, Fahal R, Verbrugh H, et al. Environmental impact of *Madurella mycetomatis*, the principal agent of human Eumycetoma in Sudan. *J Clin Microbiol* 2002;40(3):1031-1036.
- Padilla C, Novales J, Juárez V, Flores A. Minimicetoma. Presentation of a case. *Reverend Cent. Proposal Rev Mex* 2004;13:41-44.
- Fahal AH. Mycetoma: a thorn in the flesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004;98:3-11.
- Palma R, Castrillón RL, Padilla CD, Reyes F. Characterization by Actinomadura micetomas Histochemistry madurae, *Nocardia brasiliensis* and *Madurella mycetomatis*. *Proposal Rev Mex* 2005;49(2):51-58.
- Palma RA, Castrillón RL, Parra EG, Padilla CD, Arenas GR. Participation of keratinocytes in the immune response against actinomycetomas. *Dermatol Rev Mex* 2009;53 (5):225-233.
- Van de Sande WJ, Fahal WR, Verbrugh H, Van Belkum A. Polymorphisms in the genes involved in immunity innate predispose toward Mycetoma susceptibility. *J Immunol* 2007;179:3065-3074.
- Fahal AH. Mycetoma: a thorn in the flesh. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2004;98:3-11.
- Sasaki S, Nishikawa S, Miura T, Mizuki M, et al. Interleukin-4 and interleukin-10 are involved in host resistance to infection of *Staphylococcus aureus* by regulating the interferon-gamma. *Infection and Immunity* 2000;68(5):2424-2430.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of the signals, mechanisms, and roles. *J of Leukocyte Biology* 2004;75:163-179.
- Cormack H. The histology and their methods of study: autopsy of HAM. 1987;1-28.

11. Palma RA, Castrillón RL, Pizaña CA, Vega-Memije E, et al. Subpopulations of T lymphocytes in the mycetoma. *Dermatol Rev Mex* 2007;51(6):212-218.
12. Palma RA, Castrillón RL, Padilla DC, Rosas HL, Márquez C. Purification and determination of the structure of polysaccharides are caused by *Actinomyces actinomycetomas* grain Union cement madurae and *Nocardia brasiliensis*. *Dermatol Rev Mex* 2006;50:165-173.
13. Palma RA, Castrillón RL, Encinas PM, Padilla DC, Arenas GR. Participation of keratinocytes in him immune response against actinomycetoma. *Dermatol Rev Mex* 2009;53 (5):225-233.
14. Pivarcsi R, Nagy I, Kemeny I. Innate immunity in the skin: how keratinocytes fight against pathogens. *Current reviews of Immunology* 2005;1(1):29-42.
15. Fahal AH, EL Toum EA, EL Hassan AM, Mahgoub ES, Gumaa SA. Host to *Madurella mycetomatis* tissue reaction: new classification. *J Vet Medi Mycology* 1995;33:15-17.

CURSO DE ESPECIALIZACION EN DERMATOPATOLOGIA

SERVICIO DE DERMATOPATOLOGIA, HOSPITAL GENERAL DE MEXICO O.D.

Requisitos para presentar la solicitud como candidato al curso de especialización y residencia en **Dermatopatología:**

1. Ser dermatólogo con reconocimiento universitario o estar cursando el último año de la especialidad de Dermatología.
2. Presentar solicitud por escrito dirigida a la **Dra. Patricia Mercadillo Pérez**, profesora titular del Curso Universitario de la Especialidad en Dermatopatología, Jefa del Servicio de Dermatopatología, Hospital General de México O.D., Tel/Fax: 50043845 y 55433794
3. Anexar a la solicitud Curriculum Vitae.
4. Entrevista con el Profesor Titular del curso. La documentación debe entregarse en el periodo del 01 de Septiembre al 30 de Octubre del 2012.
5. Se seleccionan dos candidatos.
6. El curso tendrá una duración de dos años, iniciando el primero de Marzo y concluyendo el último día de febrero. El curso es de Tiempo completo con una duración diaria de ocho horas.
7. Se extenderá diploma Universitario de la Especialización en Dermatopatología por la Universidad Nacional Autónoma de México.