

Cuantificación de linfocitos TCD4+ y TCD8+ y células NK en eumicetomas

Palma-Ramos A¹, Castrillón-Rivera LE¹, Castañeda-Sánchez JI¹, Paredes-Rojas A¹, Mendoza-Pérez F², Vega-Memije ME³, Arenas-Guzmán R⁴

Resumen

ANTECEDENTES: en el micetoma eumicético, en etapas tempranas de la infección, los fagocitos mononucleares liberan citocinas IL-1, TNF- α y TGF- β en los sitios del reconocimiento antigénico, seguido de la presentación de antígeno en ganglio, se activan los linfocitos TCD4+(H1), que son células productoras de INF- γ , mismas que, junto con los linfocitos CD8+ y las células NK, contribuyen a la activación de macrófagos, que atraen y activan neutrófilos en el sitio de la infección.

OBJETIVO: identificar y cuantificar las poblaciones de linfocitos con fenotipos CD4+ (T cooperadores), CD8+ (T citotóxicos) y células NK (citocidas naturales) productoras de INF- γ , presentes en biopsias de pacientes con diagnóstico de eumicetoma.

MATERIAL Y MÉTODO: estudio observacional y transversal, efectuado de abril a noviembre de 2016, en el que se utilizaron cortes histológicos de biopsias de seis pacientes con eumicetomas, se realizaron tres cortes por muestra. A partir de técnicas histológicas, se obtuvieron tres cortes de cada muestra, la primera laminilla se tiñó con la técnica de hematoxilina-eosina, la segunda se utilizó para la determinación de células con perfil CD4+ usando técnicas de inmunofluorescencia y la tercera para la determinación de células con perfil CD8+ y NK, para tal efecto se utilizaron los anticuerpos marcados con fluorocromos anti-human CD4-FITC, anti-human CD8-FITC y anti-human CD56, conjugado Tri-Color.

RESULTADOS: se identificó la presencia de las tres estirpes de linfocitos estudiados en los cortes de biopsias de eumicetomas; sin embargo, los porcentajes de células cuantificadas fueron muy diferentes, en seis cortes histológicos se encontró 97% de linfocitos TCD4+, 1% de linfocitos TCD8+ y 2 % de células NK.

CONCLUSIÓN: de las poblaciones cuantificadas en las biopsias provenientes de pacientes con diagnóstico de eumicetoma, la más abundante correspondió a los linfocitos TCD4+.

PALABRAS CLAVE: eumicetoma, inmunofluorescencia, subpoblaciones de linfocitos T.

¹ Laboratorio de Inmunobiología.

² Laboratorio de Biología Experimental. Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Ciudad de México.

³ Servicio de Dermatología.

⁴ Sección de Micología. Hospital General Dr. Manuel Gea González, Ciudad de México.

Recibido: mayo 2017

Aceptado: julio 2017

Correspondencia

Dr. Alejandro Palma Ramos
alpalma@correo.xoc.uam.mx

Este artículo debe citarse como

Palma-Ramos A, Castrillón-Rivera LE, Castañeda-Sánchez JI, Paredes-Rojas A y col. Cuantificación de linfocitos TCD4+, TCD8+ y células NK en eumicetomas. Dermatol Rev Mex. 2017 nov;61(6):449-456.

Dermatol Rev Mex 2017 November;61(6):449-456.

Quantification of TCD4+ and TCD8+ lymphocyte and NK cells in eumycetomas.

Palma-Ramos A¹, Castrillón-Rivera LE¹, Castañeda-Sánchez JI¹, Paredes-Rojas A¹, Mendoza-Pérez F², Vega-Memije ME³, Arenas-Guzmán R⁴

Abstract

BACKGROUND: In mycetoma, in the early stages of fungal infection, mononuclear phagocytes release IL-1, TNF- α and TGF- β cytokines at antigen recognition sites, followed by the presentation of antigen into lymph node, TCD4+(H1) lymphocytes are activated, which are producer cells of INF- γ , which together with TCD8+ lymphocytes and NK cells contribute to the activation of macrophages, which attract and activate neutrophils at the site of infection.

OBJECTIVE: To identify and quantify lymphocyte populations with CD4+ (helper T), CD8+ (cytotoxic T), and NK cells (natural killer) cells producing INF- γ , present in biopsies of patients diagnosed with eumycetoma.

MATERIAL AND METHOD: An observational and cross-sectional study was done from April to November 2016, with histological sections of biopsies of six patients with eumycetomas, three cuts were made per sample. From histological techniques, three sections of each sample were obtained, the first lamella was stained with hematoxylin-eosin technique, the second one was used for the determination of cells with CD4+ profile using immunofluorescence techniques and the third for the determination of cells with a CD8+ and NK profile. Anti-human CD4-FITC, anti-human CD8-FITC and anti-human CD56, Tri-Color conjugate labeled antibodies were used.

RESULTS: The presence of the three strains studied in the biopsy sections of eumycetomas was found, although the percentages of quantified cells were very different; in the six histological sections, 97% of TCD4+ cells were found, 1% of TCD8+ lymphocytes and 2% of NK cells.

CONCLUSION: Of the populations quantified in biopsies from patients diagnosed with eumycetomas, the most abundant corresponded to TCD4+ lymphocytes.

KEYWORDS: eumycetoma; immunofluorescence; T lymphocyte subpopulations

¹ Laboratorio de Inmunobiología.

² Laboratorio de Biología Experimental. Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Ciudad de México.

³ Servicio de Dermatología.

⁴ Sección de Micología. Hospital General Dr. Manuel Gea González, Ciudad de México.

Correspondence

Dr. Alejandro Palma Ramos
alpalma@correo.xoc.uam.mx

ANTECEDENTES

El micetoma es un síndrome anatomoclínico crónico, caracterizado por tumefacción, fístulas y gránulos (microcolonias de los agentes etiológicos).^{1,2} El progreso de la enfermedad puede llegar a afectar tejido óseo, causando deformación del miembro asociado. El eumicetoma es causado por más de 30 especies de hongos filamentosos, septados, hialinos o dematiáceos, aislados de tierra, detritus vegetal, madera y plantas. De acuerdo con la apariencia de los gránulos se clasifican en:

- Eumicetoma de gránulos blancos, los agentes principales son: *Pseudallescheria boydii* (*Scedosporium apiospermum*), *Acremonium* spp y *Fusarium* spp. Otras especies encontradas son: *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus flavus*. Algunos dermatofitos (*Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*) también pueden causar eumicetomas.
- Eumicetoma de gránulos negros, los agentes principales son: *Madurella mycetomatis*, *Trematosphaeria grisea* (antes *Madurella grisea*) y *Exophiala janselmaei*. Otros agentes relacionados son: *Cladophialophora* spp, *Curvularia* spp y *Phialophora verrucosa*.³⁻⁵

El eumicetoma representa 3.4% de los micetomas en México, de ellos, las especies más frecuentes son *Trematosphaeria grisea* y *Madurella mycetomatis*,⁶ forma parte de las micosis subcutáneas que se entienden como infecciones micóticas que afectan principalmente al tejido subcutáneo.⁷ Las tasas de mortalidad varían entre 4 y 10% en infecciones localizadas y pueden ser tan altas como 83 a 94% en la enfermedad diseminada;⁸ en los eumicetomas se identifican hifas de 4 a 5 micras de diámetro y sobrevienen vesículas en la periferia del grano. El estudio histopatológico se caracteriza por un granu-

loma supurativo,⁹ los hongos son reconocidos por las células del sistema inmunitario innato (por ejemplo células dendríticas y macrófagos), que unen componentes de las paredes fúngicas gracias a los receptores que reconocen patrones (PRR) expresados en la superficie de las células. Los receptores de lectina tipo C (o CLR, como la dectina-1) son particularmente importantes en la inmunidad antifúngica, aunque otros, como los TLRs (receptores tipo Toll), también son importantes. Cuando los receptores que reconocen patrones reconocen a un hongo, producen señales a través de colas intracelulares o moléculas asociadas (FcRγ), lo que resulta en fagocitosis, iniciación de mecanismos de destrucción (por ejemplo, producción de especies reactivas de oxígeno) y contribuyen al desarrollo de respuestas inmunitarias adaptativas. La inmunidad adaptativa frente a hongos sólo se conoce parcialmente, aunque al parecer las células TCD4+, que producen IFN-γ (Th1) o IL-17 (Th17) son los mayores protectores contra las infecciones fúngicas porque ayudan a las células innatas efectoras, como neutrófilos y macrófagos, a la correcta destrucción.¹⁰

En eumicetomas causados por *Madurella mycetomatis* se han encontrado tres tipos de reacción inflamatoria,¹¹ la reacción tipo I se distingue por una zona de neutrófilos que rodean al grano, una zona intermedia de macrófagos, células gigantes y una zona periférica que contiene linfocitos y células plasmáticas. La reacción tipo II no tiene la zona de neutrófilos y el grano está rodeado por macrófagos y células gigantes. La reacción tipo III consiste en un granuloma epitelioides discreto, con células gigantes tipo Langhans, sin granos bien formados;¹² mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha demostrado que la reacción tipo I es positiva para CD15 (neutrófilos) en la zona que rodea al grano; la zona intermedia es positiva para CD68 (macrófagos) y CD3 (linfocitos T), mientras que la zona periférica contiene células CD20+ (linfocitos B). Se demostró la existencia

de IgG, IgM y complemento en la superficie de los granos y en los filamentos que le rodean. Los neutrófilos y macrófagos recluidos en la lesión por el complemento participan en el ataque al grano. El perfil de citocinas en la lesión y en los ganglios linfáticos regionales corresponde a IL-4 e IL-10 provenientes de las células Th2.¹³

Las células T cooperadoras específicas del antígeno pueden ser principalmente de dos tipos: Th1 y Th2, de acuerdo con las citocinas que produzcan y su función efectora. La diferenciación a células Th1, que producen IL-2, IFN- γ y linfotóxina, es estimulada por la IL-12 e IFN- γ ; mientras las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, dependientes de IL-4. El IFN- γ es representativo de las citocinas del tipo Th1 y un inhibidor del crecimiento de las células Th2. La IL-10 es una citocina con actividad antiinflamatoria.¹⁴

El objetivo de este trabajo es identificar y cuantificar las poblaciones de linfocitos con fenotipos CD4+ (T cooperadores), CD8+ (T citotóxicos) y NK (citocidas naturales) productoras de IFN- γ , presentes en biopsias de eumicetomas humanos, mediante microscopía de fluorescencia.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio observacional y transversal efectuado con una muestra por conveniencia en seis cortes histopatológicos proporcionados por el servicio de Dermatopatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González. El estudio se realizó de abril a noviembre de 2016.

Biopsias

Se utilizaron cortes histológicos de biopsias de seis pacientes con diagnóstico de eumicetoma: tres casos causados por *Madurella mycetomatis* y tres por *Acremonium*, en los que el agente etiológico fue tipificado por histología, con promedio de cinco años de evolución de la enfermedad.

Diagnóstico histológico

En los pacientes con diagnóstico de micetoma, se observó acantosis y papilomatosis, con infiltrado denso que ocupaba la dermis media y profunda constituida por microabscesos de polimorfonucleares rodeados por linfocitos, histiocitos y numerosos vasos neoformados.

Técnica histológica

Se obtuvieron tres cortes histológicos de cada biopsia. Uno se tiñó con hematoxilina-eosina para identificar al eumicetoma.¹⁵ En el segundo y tercer corte se hizo el análisis *in situ* con anticuerpos monoclonales marcados con anti-CD4+ humano fluoresceína (FITC), anti-CD8+ humano fluoresceína (FICT) y anti-humano CD56 conjugado Tri-Color, observados en fluorescencia con una lámpara de argón de 50 W con longitudes de onda que abarcaran 530 nm (FITC) y 585 nm (PE).

Para desparafinar, los cortes se sometieron sucesivamente a baños con xilol (10 minutos), xilol-alcohol absoluto (5 minutos), alcohol absoluto (5 minutos), alcohol de 96° (5 minutos), alcohol de 70° (5 minutos) y agua destilada (5 minutos). Para el diagnóstico de micetoma se realizaron las tinciones por hematoxilina-eosina.

Epifluorescencia *in situ*

Las muestras desparafinadas son hidratadas con PBS 1X (pH 7.4) durante cinco minutos; se bloquearon con PBS-gelatina (0.05%) durante cinco minutos y se procedió a realizar los marajes con los anticuerpos específicos: anti-human CD4+FITC catálogo número MHCD0401 (CALTAG Laboratories), anti-human CD8+FITC catálogo número 300906 (BioLegend) y anti-human CD56 conjugado Tri-Color (Invitrogen), que fueron diluidos 1:100 en solución de fosfatos (PBS gelatina); las muestras con los anticuerpos

se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y posteriormente se incubaron 24 horas más a 4°C; todas las laminillas se lavaron con PBS 1X cinco veces y se montaron con una gota de glicerol-PBS (9:1) en cubreobjetos limpios para su posterior observación en microscopio de fluorescencia (Zeiss Inc.).

Cuantificación celular

Se contaron 100 células en cada corte y se identificaron las poblaciones de linfocitos marcadas.

RESULTADOS

En los cortes teñidos con hematoxilina-eosina (H-E) de eumicetomas (con granos negros), se identificaron granos de color marrón, con adherencia de neutrófilos en la superficie característicos de *Madurella mycetomatis* (**Figura 1**); se efectuó el marcaje en el que los linfocitos CD4+ se observaron de color verde (FITC, **Figura 2**), los linfocitos TCD8+ también se observaron en verde, pero en otro corte (**Figura 3**) y las células NK en naranja rojizo (**Figura 4**).

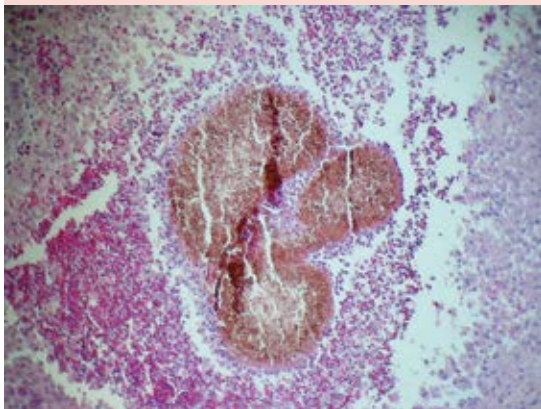


Figura 1. Micetoma por *Madurella mycetomatis* (grano negro), teñido con H-E observado a 10X.

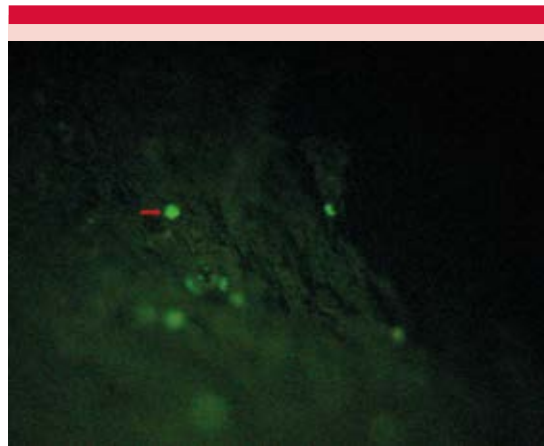


Figura 2. Micetoma por *Madurella mycetomatis* (grano negro). Linfocitos TCD4+ marcados con anticuerpo anti-CD4+ fluoresceína (FITC), 40X.

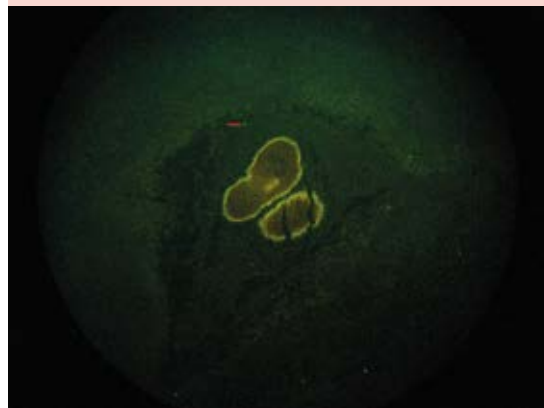


Figura 3. Micetoma por *Madurella mycetomatis* (grano negro). Linfocitos TCD4+ marcados con anticuerpo anti-CD8+ fluoresceína (FITC), 10X.

En los cortes teñidos con H-E de eumicetomas (con granos blancos), se identificó *Acremonium* (**Figura 5**) y al efectuar el marcaje de los linfocitos se observó la marca de los CD4+ en verde (FITC, **Figura 6**), los linfocitos TCD8+ también se observaron en verde, pero en otro corte (**Figura 7**) y las células NK en naranja (**Figura 8**).

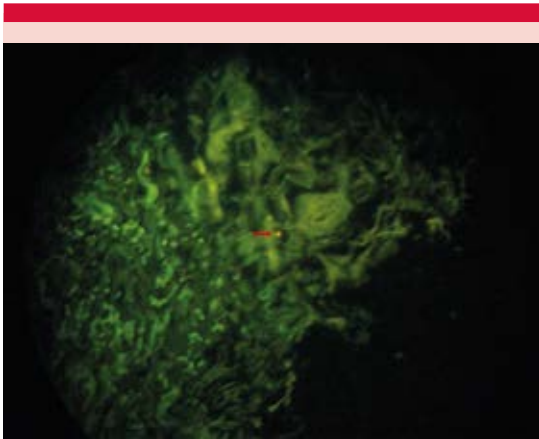


Figura 4. Micetoma por *Madurella mycetomatis* (grano negro). Linfocitos NK marcados con anticuerpo anti-CD56 conjugado Tri-Color 40X.

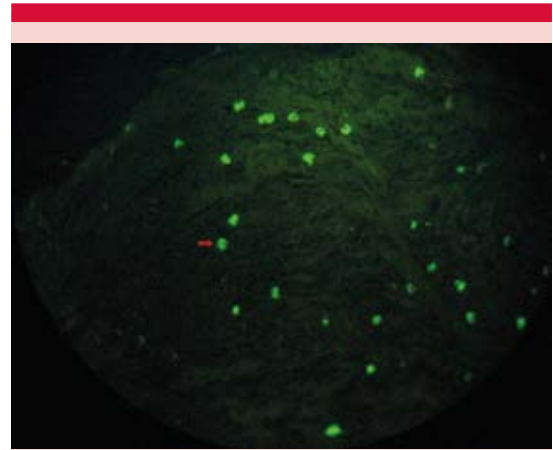


Figura 6. Eumicetoma por *Acremonium* (grano blanco). Linfocitos TCD4+ marcados con anticuerpo anti-CD4+ fluoresceína (FITC) 40X.

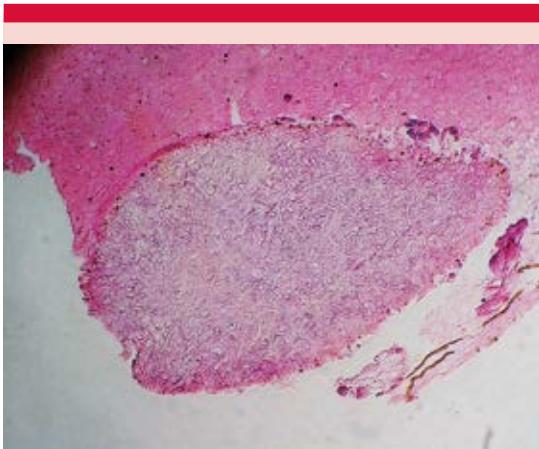


Figura 5. Eumicetoma por *Acremonium* (grano blanco) teñido con H-E observado a 10X.

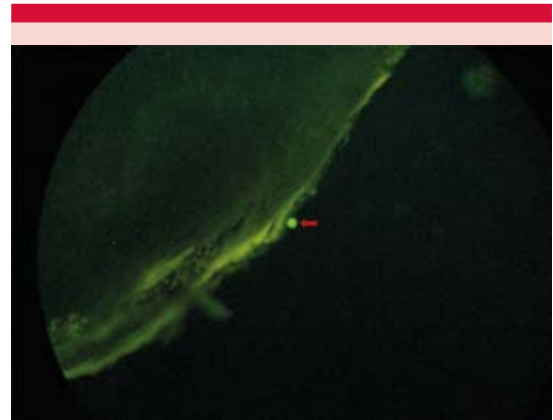


Figura 7. Eumicetoma por *Acremonium* (grano blanco). Linfocitos TCD8+ marcados con anticuerpo anti-CD8+ fluoresceína (FITC) 40X.

Al contar 100 células en cada corte se identificaron las poblaciones de linfocitos marcadas (**Cuadro 1**); se observó la relación entre las células TCD4+, TCD8+ y NK en cada eumicetoma, ya sea de granos negros o blancos.

En los eumicetomas estudiados hubo 97% de linfocitos TCD4+, 1% de linfocitos TCD8 y 2% de células NK.

DISCUSIÓN

De acuerdo con la clasificación propuesta por Fahal en 2003,¹³ los micetomas se ubicarían en una reacción del tipo I, que se distingue porque el grano está casi siempre rodeado por una capa de leucocitos polimorfonucleares. En el interior, la mayor parte son neutrófilos y están en contacto con la superficie del grano, y



Figura 8. Eumicetoma por *Acremonium* (grano blanco), células NK marcadas con anticuerpo anti-CD56 conjugado Tri-Color 10X.

en algunas ocasiones lo penetran causando su fragmentación. La zona contigua está compuesta por macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y escasos neutrófilos. Ésta es la zona que se utilizó en este trabajo para buscar la mayor cantidad de linfocitos e identificarlos por medio del marcaje y fluorescencia. Se observó una gran diferencia en el número de leucocitos encontrados porque los eumicetomas causados por *Madurella mycetomatis* y los causados por *Acremonium* tienen alto porcentaje de linfocitos CD4+ y muy pocos linfocitos de las otras subpoblaciones analizadas (CD8+ y NK). Estas proporciones son importantes porque existen dos tipos de

linfocitos T: los linfocitos TCD4+ y los TCD8+ (CTL), de los que la estirpe CD4+ se divide en linfocitos Th1 y Th2. Los clones Th1 sintetizan IL-2, IFN- γ y linfotóxina (LT). Su expresión no se identifica en los clones Th2, porque éstos sólo sintetizan cantidades medibles de IL-4, IL-5 y probablemente IL-6. El IFN- γ es importante en la regulación de la respuesta inmunitaria porque estimula la actividad bactericida de los fagocitos, la presentación de antígeno unido al complejo principal de histocompatibilidad de clases I y II y dirige la interacción endotelio-leucocito.

En la etapa temprana de la infección, los fagocitos mononucleares liberan citocinas como IL-1, TNF- α y TGF- β en los sitios del reconocimiento antigénico. Estas interleucinas inducen la secreción de citocinas quimiotácticas IL-8 y proteína quimiotáctica de monocitos por las células estromales y la expresión de moléculas de adhesión ELAM-I e ICAM-I en las células endoteliales, para iniciar la acumulación de neutrófilos, células NK (producen IFN- γ y macrófagos (IL-12, IL-10, IL-15 e IL-18), para activar los linfocitos T y B (células de la respuesta inmunitaria específica) y así eliminar el antígeno del tejido blanco.¹⁶

El eumicetoma es un proceso inflamatorio crónico con abundancia de neutrófilos. Este fenómeno puede deberse a la activación de macrófagos por el IFN- γ secretado por las células CD4+ (Th1), TCD8+ y NK presentes en las lesiones.

Cuadro 1. Cuantificación de linfocitos TCD4+, TCD8+ y NK en 100 células contadas en cada uno de seis cortes histológicos de eumicetomas, tres de granos negros (*Madurella mycetomatis*) y tres de granos blancos (*Acremonium*)

Muestra	CD4+	CD8+	NK (CD56)	Grano
1	97	0	3	Negro
2	92	2	6	Negro
3	95	2	3	Blanco
4	100	0	0	Blanco
5	97	0	3	Negro
6	99	1	0	Blanco

CONCLUSIÓN

De las poblaciones cuantificadas en las biopsias provenientes de pacientes con diagnóstico de eumicetoma, la más abundante correspondió a los linfocitos TCD4+.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado a través del proyecto CONACyT número SEP-CB-2015-01-258735.

REFERENCIAS

1. Fahal A, Mahgoub ES, Hassan AME, Rahman AM. Mycetoma in the Sudan: An update from the Mycetoma Research Centre, University of Khartoum, Sudan. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9(3):1-19.
2. Ahmed AO, Displaces N, Leonard P, Goldstein F, De Hoog S, Verbrugh H, Belkum A. Molecular detection and identification of agents of eumycetoma: detailed report of two cases. *J Clin Microbiol* 2003;41(12):5813-5816.
3. Carrasco-Zuber JE, Navarrete-Dechent C, Bonifaz A, Fich F, Vial-Letelier V, Berroeta-Mauriziano D. Afectación cutánea en las micosis profundas: una revisión de la literatura. Parte 1: micosis subcutáneas. *Actas Dermosifiliogr* 2016;107:806-815.
4. Isa-Isa R, Arenas R. Micosis superficiales subcutáneas y pseudomicosis en República Dominicana, Graphimedic, Mexico 2009;9(2):26-32.
5. Welsh O, Arenas R. Subcutaneous mycoses. *Clin Dermatol* 2012;30:367-8.
6. López-MR, Méndez-TL, Bonifaz A, Arenas GR y col. Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos. *Gac Méd Méx* 2013;149:586-592.
7. Arenas GR, Moreno CG, Welsh O. Classification of subcutaneous and systemic mycoses. *Clin Dermatol* 2012;30:369-371.
8. Gonzalez ST, Pritt B, Lawrence E, Gibson L, Nneka I. Diagnosis of deep cutaneous fungal infections: Correlation between skin tissue culture and histopathology. *J Am Acad Dermatol* 2014;71(2):293-301.
9. Hay RJ. Agents of eumycotic mycetomas in to play. Wilson's microbiology and microbial infections. En: Ajello L, Hay RJ, editors. Vol. 4. Nueva York: Oxford University Press, 1998;488-96.
10. Miró MS, Vigezzi C, Rodríguez E, Icely PA, et al. Innate receptors and IL-17 in the immune response against human pathogenic fungi. *Rev de la Fac de Cien Méd* 2016;73(3):188-196.
11. Fahal AH, El-Hassan AM, Bela Veress. Cell phenotypes, immunoglobulins and complement in lesions of eumycetoma caused by *Madurella mycetomatis*. *Sudanese J Dermatol* 2006;4(1):2-5.
12. Fahal AH, El Toum EA, Gumaa SA, Maghoub ES, El-Hassan AM. Host tissue reaction to *Madurella mycetomatis*: new classification. *J Med Vet Mycol* 1995;33:103-106.
13. Fahal AH. Mycetoma: a thorn in the flesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004;98:3-11.
14. Sasaki S, Nishikawa S, Miura T, Mizuki M, et al. Interleukin-4 and interleukin-10 are involved in host resistance to *Staphylococcus aureus* infection through regulation of gamma interferon. *Infect Immun* 2000;68:2424-2430.
15. Cormack DH. La histología y sus métodos de estudio. En: *Histología de HAM*. México: Interamericana, 1987;1-28.
16. Hernández-Urzúa MA, Alvarado-Navarro A. Interleucinas e inmunidad innata. *Rev Biomed* 2001;12:272-80.