



Presencia de receptores tipo Toll (TLR2 y TLR4) en actinomicetomas por *Actinomadura madurae*

Presence of Toll receptors (TLR2 and TLR4) in actinomyctomas by *Actinomadura madurae*

Alejandro Palma Ramos,* Araceli Monroy Núñez,* Laura Castrillón Rivera,* Jorge Ismael Castañeda Sánchez,* María del Carmen Padilla Desgarenes†

RESUMEN

Antecedentes: El micetoma es una infección crónica de la piel y de los tejidos subyacentes con tendencia a afectar huesos; se caracteriza por aumento de volumen y fistulas. Cuando el agente causal es un actinomiceto se denomina actinomicetoma, en donde *Actinomadura madurae* es causante de 7.9 % de los casos en México y predomina en el sexo femenino. Se estudiaron los receptores tipo Toll (2 y 4) en cortes de piel de cinco pacientes con esta infección, ya que los queratinocitos presentes juegan un papel importante en la respuesta de inmunidad innata de este tejido, secretando citocinas proinflamatorias, péptidos antimicrobianos, enzimas inducibles y moléculas de adhesión. **Material y métodos:** Se utilizaron cinco bloques de parafina con tejido de pacientes con diagnóstico de actinomicetoma por *Actinomadura madurae* y uno de piel humana normal (testigo), atendidos en el Centro Dermatológico «Dr. Ladislao de la Pascua». Se realizaron tres cortes por muestra: uno para la realización de la tinción con hematoxilina y eosina (H&E), y dos para realizar las técnicas inmunohistoquímicas para TLR2 y TLR4, utilizando los anticuerpos IgG anti-TLR2 o IgG anti-TLR4 humanos hechos en ratón, y la interacción se reveló con un kit comercial (Cell and Tissue Staining Kit, mouse Kit, HRP-AEC System by R&D Minneapolis, MN, USA Cat No. CTS003). **Resultados:** Al realizar la técnica inmunohistoquímica en los cortes con actinomicetoma por *Actinomadura madurae* para demostrar la presencia del TLR2 y TLR4, se observa coloración roja en la zona de queratinocitos, aunque con mayor intensidad para el TLR4 que para el TLR2. **Conclusión:** La presencia del TLR4 es mayor en comparación con el TLR2 en los queratinocitos de la piel con actinomicetoma por *Actinomadura madurae*, en los cinco pacientes estudiados por la técnica de hibridación *in situ*.

Palabras clave: Actinomicetoma, *Actinomadura madurae*, receptores tipo Toll 2 y 4.

ABSTRACT

Background: Mycetoma is a chronic infection of the skin and underlying tissues with a tendency to affect bones. It is characterized by increased volume and fistulas. When the causative agent is an actinomycete, it is called an actinomyctoma, where *Actinomadura madurae* is the cause of 7.9% of cases in Mexico and predominates in the female sex. Toll-like receptors (2 and 4) in skin sections of five patients with this infection were studied since the keratinocytes present play an important role in the innate immunity response of this tissue, secreting proinflammatory cytokines, antimicrobial peptides, inducible enzymes, and adhesion molecules. **Material and methods:** Five blocks of paraffin were used with tissue from patients diagnosed with actinomyctoma due to *Actinomadura madurae* and one from normal human skin (control), treated at the Dermatological Center «Dr. Ladislao de la Pascua». Three cuts were made per sample, one to perform hematoxylin and eosin (H&E) staining, and two to perform immunohistochemical techniques for TLR2 and TLR4, using the human IgG anti-TLR2 or IgG anti-TLR4 antibodies made in mouse, and the interaction was revealed with a commercial kit (Cell and Tissue Staining Kit, mouse Kit, HRP-AEC System by R&D Minneapolis, MN, USA Cat No. CTS003). **Results:** When performing the immunohistochemical technique on the sections with actinomyctoma due to *Actinomadura madurae* to demonstrate the presence of TLR2 and TLR4, red coloration is observed in the keratinocyte area, although with greater intensity for TLR4 than for TLR2. **Conclusion:** The presence of TLR4 is higher compared to TLR2 in skin keratinocytes with *Actinomadura madurae* actinomyctoma, in the five patients studied by the *in situ* hybridization technique.

Keywords: Actinomyctoma, *Actinomadura madurae*, Toll 4 and 2 receptors.

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

† Laboratorio de Micología, Centro Dermatológico «Dr. Ladislao de la Pascua», Secretaría de Salud, CDMX.



ANTECEDENTES

El micetoma es una infección crónica de la piel y de los tejidos subyacentes con tendencia a afectar huesos. Se caracteriza por un aumento de volumen relativamente indoloro y fístulas a través de las cuales se eliminan pus y granos, constituidos por filamentos. Los agentes desencadenantes son de origen exógeno y pueden ser hongos causales de eumicetoma o por Actinomycetales que producen actinomicetoma con 96.52% de frecuencia, en los cuales la *Nocardia brasiliensis* es la bacteria más frecuente, se observa en 65.58% de los casos, seguida de *Actinomadura madurae* con 7.93%, que además predomina en el sexo femenino.¹

El actinomicetoma por *Actinomadura madurae* se localiza preponderantemente en la parte media del pie, sobre todo afecta la planta y los bordes; puede haber artrosis de las articulaciones, con limitación de los movimientos e incapacidad para la deambulaci3n.² En el estudio histopatol3gico se observan granos multilobulados con bordes festonados o cartogr3ficos con una banda perif3rica que se tiñe intensamente con hematoxilina, mientras que el centro se observa p3ldido. Dichos granos est3n rodeados por franjas de largos flecos, constituidos por filamentos, frecuentemente bifurcados;³ alrededor del grano se encuentra una inflamaci3n neutrof3lica perifocal.^{4,5}

La piel est3 constituida por la epidermis, dermis e hipodermis. En la primera, encontramos a los queratinocitos hasta en 90%, seguidos por c3lulas de Langerhans y linfocitos; los queratinocitos tambi3n participan en la funci3n del sistema inmunitario. La piel es la primera l3nea de defensa contra infecciones y los queratinocitos son los responsables de secretar mol3culas que estimulan la inflamaci3n, almacenando y produciendo citocinas como IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, GM-CSF, TGF β , M-CSF, PDGF, ETAF, TNF α .⁶ La caracterizaci3n de los receptores tipo Toll (TLRs) en estas c3lulas contribuye al entendimiento de la respuesta inmunitaria innata, ya que se encuentran en contacto con el medio ambiente y son responsables del reconocimiento molecular asociado a pat3genos (PAMPs). En queratinocitos se ha encontrado que expresan siete miembros de los receptores tipo Toll humanos que son: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR9, para la defensa cut3nea del hu3sped.^{7,8} El heterod3mero TLR1/TLR2 se asocia al triacil-lipop3ptido,⁹ el TLR2 se une a lipoprote3nas bacterianas, 3cido lipoteicoico (LTA), *lipoarabinomano* (LAM) y el p3ptidoglicano (PGN) de bacterias Gram-positivas,¹⁰⁻¹² el heterod3mero TLR6/TLR2 es necesario para el reconocimiento de diacil-lipop3ptidos,

que son comunes en la pared celular de bacterias Gram-positivas y en el reconocimiento de PAMPs de hongos pat3genos.⁹ El TLR3 reconoce RNA de doble cadena viral (ssRNA).¹³ El complejo CD14-TLR4/4MD-2 se une al lipopolisac3rido (LPS) de bacterias Gram-negativas, a la prote3na F viral (induce la secreci3n de prote3nas de choque t3rmico),^{14,15} el TLR5 se une a la flagelina bacteriana,^{16,17} y el TLR9 que se encuentra en el ret3culo endopl3smico participa en la iniciaci3n de la respuesta inmune, seguida al daño epid3rmico o infecci3n.¹⁸⁻²⁰

El objetivo de este trabajo es demostrar la presencia *in situ* de los receptores TLR2 y TLR4, en queratinocitos de piel, en cortes de pacientes con actinomicetoma por *Actinomadura madurae*, mediante el uso de t3cnicas inmunohistoqu3micas.

MATERIAL Y M3TODOS

Estudio prospectivo en el que se utilizaron cinco bloques de parafina con tejido de pacientes con diagn3stico de actinomicetoma por *Actinomadura madurae* y uno de piel humana normal. Fueron atendidos en el Centro Dermatol3gico «Dr. Ladislao de la Pascua». Este estudio se realiz3 de septiembre de 2019 a enero de 2020, en el laboratorio de Inmunobiolog3a de la Universidad Aut3noma Metropolitana Xochimilco. Se realizaron tres cortes por muestra: uno para la tinci3n con hematoxilina y eosina (H & E), y dos para las t3cnicas inmunohistoqu3micas para TLR2 y TLR4.

T3cnica para la tinci3n con hematoxilina-eosina.²¹ Con el tejido ya desparafinado, colorear con hematoxilina de Harris durante un minuto y lavar; posteriormente, diferenciar con alcohol-3cido, lavar y virar con agua amoniacal; lavar nuevamente, colorear con eosina durante 30 segundos, deshidratar y montar.

Marcaje por inmunohistoqu3mica para la detecci3n de TLR2 o TLR4 *in situ*. Se utilizaron los anticuerpos IgG anti-TLR2 o IgG anti-TLR4 humanos hechos en rat3n; la interacci3n se revel3 utilizando un kit comercial (Cell and Tissue Staining Kit, mouse Kit, HRP-AEC System by R&D Minneapolis, MN, USA Cat No. CTS003). Desparafinar y dejar la muestra por cinco minutos con 1-3 gotas de bloqueador de peroxidasa, lavar con PBS durante cinco minutos, incubar con 1-3 gotas de bloqueador de suero durante 15 minutos, incubar con 1-3 gotas de bloqueador de avidina durante 15 minutos, lavar, incubar con 1-3 gotas de bloqueador de biotina durante 15 minutos, lavar, incubar con el anticuerpo primario (IgG anti-TLR2 o IgG anti-TLR4 humano hecho en rat3n) a una concentraci3n 1:50 durante 30 minutos a 37°C y, posteriormente, refrigerar durante 24 horas, lavar tres

veces, incubar con 1-3 gotas de anticuerpo secundario anti-ratón biotinizado durante 60 minutos, lavar, incubar con 1-3 gotas de HSS-HRP (conjugado de estreptavidina) durante 30 minutos, lavar, adicionar el cromógeno AEC (3-amino-9-etilcarbazol) necesario (100-200 μ L), durante 20 minutos, lavar, colocar hematoxilina de Mayer's, y montar con solución acuosa de montaje.

RESULTADOS

Se obtuvieron tres cortes por muestra (cinco muestras) con diagnóstico histopatológico de actinomicetoma por *Actinomadura madurae*, y uno de piel normal como testigo. A uno de los tres cortes se les realizó la técnica de hematoxilina-eosina para observar el grano característico de *Actinomadura madurae* en los tejidos de los pacientes (**Figura 1**).

Se trabajó una muestra de piel normal, la cual fue considerada como testigo para el estudio. A dos cortes se les realizó el estudio inmunohistoquímico: uno con IgG anti-TLR2 hecho en ratón (**Figura 2**) y al otro con IgG anti-TLR 4 hecho en ratón (**Figura 3**) y el Cell and Tissue Staining Kit, mouse Kit, HRP-AEC System by R&D Minneapolis, MN, USA Cat No. CTS003.

Al realizar la técnica inmunohistoquímica en los cortes con actinomicetoma por *Actinomadura madurae* para demostrar la presencia del TLR2 con IgG anti-TLR2 humana y el Cell and Tissue Staining Kit, se observa una coloración roja en la zona de queratinocitos, mostrando la presencia del receptor, aunque en algunos casos más intensa que en otros (**Figura 4**).

Lo mismo ocurre al realizar el marcaje para TLR4 en los cortes con actinomicetoma por *Actinomadura madurae* tratados con IgG anti-TLR 4 humano y el Cell

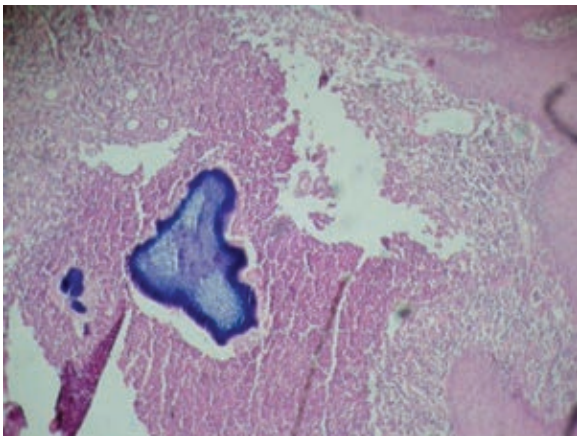


Figura 1: Actinomicetoma por *Actinomadura madurae* (H&E 40x).

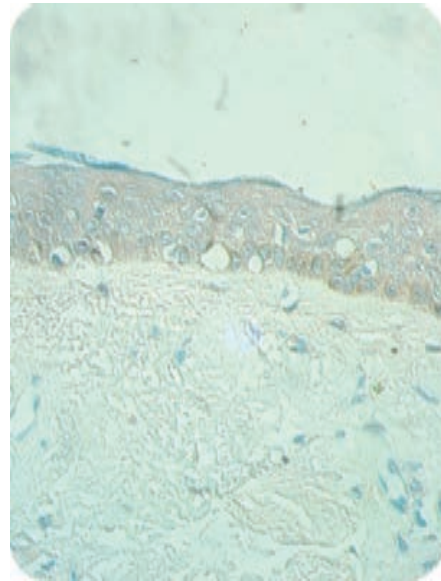


Figura 2: Inmunohistoquímica de piel normal, utilizando IgG anti-TLR2 humano y el kit (Cell and Tissue Staining Kit, mouse Kit, HRP-AEC System by R&D Minneapolis, MN, USA Cat No. CTS003), no se observa coloración roja en ninguna zona de la piel (40x).

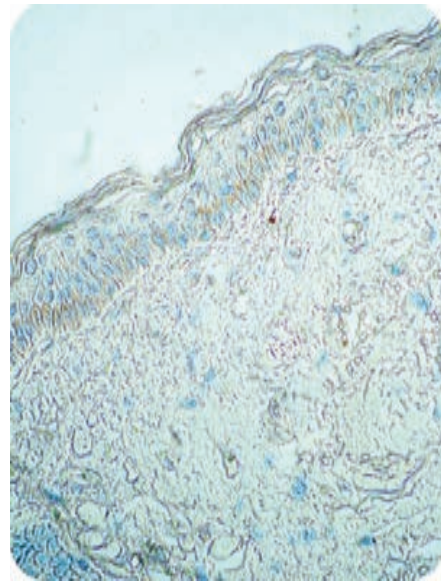


Figura 3: Inmunohistoquímica de piel normal, utilizando IgG anti-TLR4 humano y el kit (Cell and Tissue Staining Kit, mouse Kit, HRP-AEC System by R&D Minneapolis, MN, USA Cat No. CTS003), no se observa coloración roja en ninguna zona de la piel (40x).

and Tissue Staining Kit; se observa una coloración roja en la zona de queratinocitos mostrando la presencia del receptor (**Figura 5**).

Para comparar la presencia del TLR2 y TLR4 se elaboró la **Tabla 1**, en donde la intensidad de la coloración roja es directamente proporcional a la presencia del receptor. Se observa que en todas las muestras analizadas hay presencia tanto de TLR2 como de TLR4, siendo este último el que se encuentra con mayor intensidad *in situ*.

DISCUSIÓN

La piel humana normal está colonizada por una amplia variedad de microorganismos como son el *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* y *Malassezia furfur*, que se encuentran como flora normal; mientras que los microorganismos patógenos desafían constantemente la piel, la mayoría de éstos no causan síntomas clínicos. Además de la adherencia microbiana y la virulencia, los factores ambientales y locales, así como la inmunidad del huésped, son componentes importantes de las infecciones cutáneas, ya que la piel se vuelve más susceptible a las infecciones cuando la función de barrera epidérmica se ve afectada o cuando se inhiben las funciones inmunes innatas mediadas por los queratinocitos. Se ha observado que los queratinocitos reconocen una amplia variedad de microorganismos a través de sus TLRs, y en ratones deficientes en TLR2 y TLR4 demostraron que tanto TLR2 como TLR4 juegan un papel importante en la defensa del huésped contra las infecciones por *Candida albicans*.²² Estudios *in*

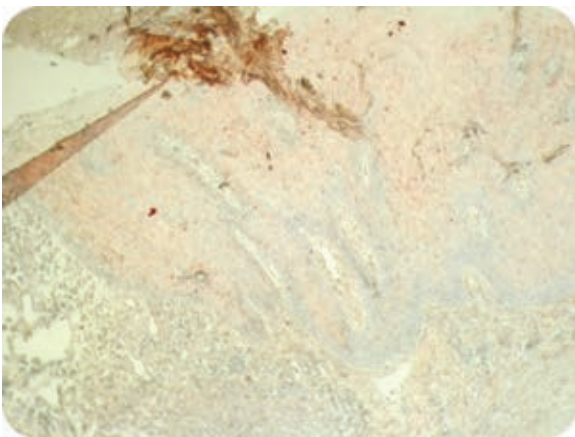


Figura 4: Inmunohistoquímica de actinomicetoma por *Actinomadura madurae*, utilizando IgG anti-TLR2 humano y el kit (Cell and Tissue Staining Kit, mouse Kit, HRP-AEC System by R&D Minneapolis, MN, USA Cat No. CTS003), la coloración roja nos muestra la presencia del TLR2 en la zona en donde se encuentran los queratinocitos de la piel (40x).

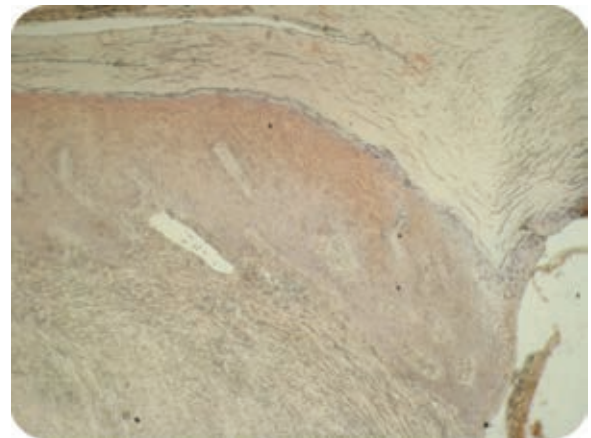


Figura 5: Inmunohistoquímica de actinomicetoma por *Actinomadura madurae*, utilizando IgG anti-TLR4 humano y el kit (Cell and Tissue Staining Kit, mouse Kit, HRP-AEC System by R&D Minneapolis, MN, USA Cat No. CTS003), la coloración roja nos muestra la presencia del TLR4 en la zona en donde se encuentran los queratinocitos de la piel (40x).

Tabla 1: Presencia de los receptores TLR2 o TLR4 en cortes de pacientes con actinomicetoma por *Actinomadura madurae*.

Paciente	TLR2	TLR4
Piel normal	-	-
Actinomicetoma por <i>Actinomadura madurae</i>		
1	++	++
2	+	++
3	++	+++
4	+	+
5	+	+

- Ausencia de coloración roja, no se manifiesta el receptor TLR2 o TLR4
Presencia del receptor TLR2 o TLR4 de acuerdo a la intensidad de color:
+ Baja, ++ Moderada, +++ Alta.

La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración del receptor tipo Toll en estudio TLR2 o TLR4.

in vitro, en donde se demuestra que los queratinocitos cultivados matan a los hongos patógenos de manera dependiente de TLR2 y TLR4, sugieren que los TLRs juegan un papel importante en la defensa antimicótica del huésped.¹⁰

En nuestro estudio, al realizar la técnica inmunohistoquímica para demostrar la presencia de TLR2 y TLR4 en cortes de cinco pacientes con actinomicetoma por *Actinomadura madurae*, encontramos que en todos los pacientes está presente el TLR2 (**Figura 4**) y con mayor concentración el TLR4 (**Figura 5**) en el área de la piel

en donde se encuentran los queratinocitos, la intensidad de color es directamente proporcional a la concentración del receptor en estudio (**Tabla 1**).

El reconocimiento de los PAMP por los TLR inicia una cascada de señalización mediada por el dominio citoplasmático del receptor Toll-interleucina 1 (TIR), que interactúa con la proteína adaptadora MyD88, y recluta a una serina/treonina quinasa asociada a IL-1R (IRAK); ésta se activa por fosforilación y se une con el factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6) que conduce a la activación de, al menos, dos vías de señalización distintas, JNK y NF- κ B. La actividad de NF- κ B al unirse a un promotor de genes ocasiona la presencia de citocinas proinflamatorias, péptidos antimicrobianos, enzimas inducibles y moléculas de adhesión que son efectos importantes de la respuesta innata.^{23,24}

CONCLUSIÓN

La presencia de TLR4 es mayor en comparación con el TLR2 en los queratinocitos de la piel con actinomicetoma por *Actinomadura madurae*, en los cinco pacientes estudiados por la técnica de hibridación *in situ*.

BIBLIOGRAFÍA

- López MR, Méndez TL, Bonifaz A, Arenas GR, Mayorga JJ, Welsh O et al. Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos. *Gac Med Mex*. 2013; 149: 586-592.
- Hevia Y, Del Pino J, Pérez AR, Alvarez MM, Rondón LA, De Albornoz M. Micetoma podálico por *Actinomadurae*. Reporte de 4 casos. *Dermatol Venez*. 1986; 24: 11-15.
- Lavalle AP, Padilla DC, Pérez GJ, Rivera I, Reynoso RS. Micetomas por *Actinomadura madurae* en México. *Rev Cent Dermatol Pascua*. 2000; 9: 19-24.
- Salipante SJ, SenGupta DJ, Hoogestraat DR, Cummings LA, Bryant BH, Natividad C et al. Molecular diagnosis of *Actinomadura madurae* infection by 16S rRNA deep sequencing. *J Clin Microbiol*. 2013; 51: 4262-4265.
- Jerez R, Schafer F, Fich F, García P, León P, González S. Micetoma actinomicótico por *Actinomadura madurae*. *Rev Chil Infectol*. 2012; 29: 459-463.
- Castrillón RL, Palma RA, Padilla DC. La función inmunológica de la piel. *Dermatol Rev Mex*. 2008; 52: 211-224.
- Andor Pivarsci A, Nagy I, Kemeny L. Innate immunity in the skin: how keratinocytes fight against pathogens. *Curr Immunol Rev*. 2005; 1: 29-42.
- Durán A, Álvarez MM, Valero N. Papel de los receptores tipo toll (TLRs) y receptores para dominios de oligomerización para la unión a nucleótidos (NLRs) en las infecciones virales. *Invest Clin*. 2014; 55: 61-81.
- Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, Smith SC, Boussouf S, Segal DM et al. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol*. 2000; 165: 7125-7132.
- Pivarsci A, Bodai L, Réthi B, Kenderessy-Szabó A, Koreck A, Széll M et al. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol*. 2003; 15: 721-730.
- Kawai K, Shimura H, Minagawa M, Ito A, Tomiyama K, Ito M. Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 2002; 30: 185-194.
- Mempel M, Voelcker V, Köllisch G, Plank C, Rad R, Gerhard M et al. Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor kappaB controlled gene activation by *Staphylococcus aureus* is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent. *J Invest Dermatol*. 2003; 121: 1389-1396.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21: 335-376.
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 1999; 189: 1777-1782.
- Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kimoto M et al. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol*. 2000; 164: 3471-3475.
- Marzano AV, Mercogliano M, Borghi A, Facchetti M, Caputo R. Cutaneous infection caused by *Salmonella typhi*. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2003; 17: 575-577.
- Hernández JC, Montoya CJ, Urcuqui IS. Papel de los receptores tipo toll en las infecciones virales: el VIH-1 como modelo. *Biomedica*. 2007; 27: 280-293.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4: 499-511.
- Curry JL, Qin JZ, Bonish B, Carrick R, Bacon P, Panella J et al. Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. *Arch Pathol Lab Med*. 2003; 127: 178-186.
- Liu L, Zhou X, Shi J, Xie X, Yuan Z. Toll-like receptor-9 induced by physical trauma mediates release of cytokines following exposure to CpG motif in mouse skin. *Immunology*. 2003; 110: 341-347.
- Cormack DH. *La histología y sus métodos de estudio*. En: Ham AW, Cormack DH, Blengio PJ. *Histología de HAM*. México: Interamericana, 1987, pp. 1-28.
- Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschuere I, Van Der Meer JW, Kullberg BJ. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis*. 2002; 185: 1483-1489.
- Zhang G, Ghosh S. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest*. 2001; 107: 13-19.
- Crespo LA, Juárez RC, Plaza MV. Papel de los receptores toll-like en las enfermedades respiratorias. *Arch Bronconeumol*. 2010; 46: 135-142.

Correspondencia:

Alejandro Palma Ramos

Departamento de Sistemas Biológicos,
Universidad Autónoma Metropolitana,
Unidad Xochimilco.
Calzada del Hueso núm. 1100, Colonia Villa Quietud,
Alcaldía Coyoacán, CP 04960, Ciudad de México.
Tel: 55 5483 7000 ext. 3622.
E-mail: alpalma@correo.xoc.uam.mx