

Artículo original

Identificación de células y mediadores inflamatorios en lesiones de pacientes con diagnóstico de micetoma

Adriana Patricia López Bárcenas,* Roberto Arenas Guzmán,* María Elisa Vega Memije,** Laura Estela Castrillón Rivera,*** Alejandro Palma Ramos***

RESUMEN

Antecedentes: el micetoma es un síndrome anatomoclínico inflamatorio no doloroso que se distingue por la aparición de fístulas en la piel, el tejido celular subcutáneo, la aponeurosis y el hueso. Es producido por bacterias (actinomycetomas) o por hongos (eumycetoma). Es más frecuente en hombres y se considera una enfermedad ocupacional. El diagnóstico se realiza al identificar el agente causal (en forma de grano) en examen directo, cultivo o estudio histopatológico. En este último, se observa infiltrado inflamatorio mixto que rodea al grano. Se han descrito tres diferentes zonas de acuerdo con la disposición de las células: la zona 1 se caracteriza por una zona de neutrófilos que rodean al grano; en la zona 2 o intermedia hay macrófagos o células gigantes, y la zona 3 o periférica contiene linfocitos y células plasmáticas. Mediante estudios de inmunohistoquímica se ha demostrado que la zona que rodea al grano es positiva para CD15 (neutrófilos); la 2 es positiva para CD68 (macrófagos) y CD3 (linfocitos T), y la zona 3 contiene células CD20+ (linfocitos B).

Objetivos: estudiar la participación del linfocito T mediante la expresión de interferón γ (INF- γ), IL-4 e IL-10 en micetomas humanos. Observar cómo funcionan los mecanismos de regulación de la respuesta inflamatoria que ejercen los linfocitos T, ya sea por medio de la estimulación de la producción de INF- γ (Th1) o de la inhibición de IL-4 e IL-10 (Th2) en el micetoma humano.

Material y métodos: se obtuvieron biopsias de pacientes con diagnóstico de micetoma en el servicio de dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González. Se tomaron muestras de nueve pacientes: cinco con micetoma por *Nocardia brasiliensis*, uno con micetoma por *Actinomyces madurae* y tres con eumycetomas (uno por *Acremonium*, otro por *Madurella mycetomatis* y el último por *M. grisea*). Se fijaron en parafina y se hizo marcaje histoquímico con Cell and tissue staining mouse kit, R&D Systems HRP-AEC SYSTEM (catalog CTS003, Avidin-biotin y 3,3'diaminobenzidina), anti-hINF- γ purified mouse monoclonal IgG1 (MAB304 R&D), anti-hIL-4 purified mouse monoclonal IgG2A (MAB285 R&D) y anti-hIL-10 purified mouse monoclonal IgG2B (MAB217 R&D).

Resultados: en los eumycetomas, 50% de las citocinas corresponden al INF- γ seguido por la IL-4 con 17%, y la IL-10 con 33%, y para los actinomycetomas, el perfil de citocinas provenientes de linfocitos fue de 35% para el INF- γ , 38% para la IL-4, y 27% para la IL-10.

Conclusión: las poblaciones de linfocitos que participan en la respuesta inmunológica de los micetomas son, sobre todo, de linfocitos CD4 + Th1 y T CD 8+ (productoras de INF- γ); posteriormente, el control lo ejercen los linfocitos CD 4+ Th2 (productores de IL-4 e IL-10). Lo cual podría explicar la regulación entre citocinas estimuladoras e inhibitoras de la respuesta celular en este síndrome.

Palabras clave: eumycetoma, actinomycetoma, micetoma, interleucinas.

ABSTRACT

Background: Mycetoma is a clinical syndrome that consists of inflammatory, painless, and deforming lesions and fistulae that affect cutaneous and subcutaneous tissues, aponeurosis and bone. It is produced by bacteria (actinomycetoma) or fungus (eumycetoma); it is more frequent in men and is considered an occupational illness. For diagnosis should be necessary to identify the etiologic agent (grain) by direct exam, culture, and histopathological study where mixed inflammatory infiltrate is observed surrounding the grain. Three inflammatory zones has been described according the cell arrangement. Zone 1 is characterized by neutrophils surrounding the grain; zone 2 or medium has macrophages and giant cells, and peripheral zone (3) has lymphocytes and plasmatic cells. Immunohistochemical tests show that cells that surround the grain (neutrophils) are positive reaction to CD15, in the middle zone the cells are positive to CD68 (macrophages) and CD3 (T lymphocytes) and in the peripheral zone the CD20+ (B lymphocytes) are present.

Objectives: To study the intervention of T lymphocyte by the INF- γ , IL-4 and IL-10 expression in human mycetoma and to observe how the regulation of inflammatory response that involve T lymphocytes is carried out, whether stimulating by INF- γ production or inhibiting IL-4 and IL-10 (Th2) in human mycetoma.

Material and methods: Biopsies of mycetoma were obtained from patients of dermatology service at Hospital General Dr. Manuel Gea Gonzalez. Nine samples were studied: five with mycetoma by *Nocardia brasiliensis*, one with mycetoma by *Actinomyces madurae* and three eumycetomas (*Acremonium*, *Madurella mycetomatis* and *M. grisea*). Biopsies were fixed in paraffin, and immunohistochemical test was carry out with Cell and tissue staining mouse kit R&D Systems HRP-AEC SYSTEM (catalog CTS003) (Avidin-biotin y 3,3'diaminobenzidine), anti-hINF- γ purified mouse monoclonal IgG1 (MAB304 R&D), anti-hIL-4 purified mouse monoclonal IgG2A (MAB285 R&D) and anti-hIL-10 purified mouse monoclonal IgG2B (MAB217 R&D).

Results: In eumycetomas, 50% of cytokines present are IFN- γ , 33% are IL-10, and 17% are IL-4. However in actinomycetoma T cell cytokines profile was 35% for IFN- γ , 38% corresponds to IL-14 and 27% to IL-10.

Conclusion: Lymphocytes populations that participate in immunological response in mycetoma are mainly CD4+ Th1 and CD8+ T (both secreting IFN- γ), lately the control depends on CD4+ Th2 lymphocytes (secreting IL-4 and IL-10). This fact could explain the regulation between stimulating and inhibitory cytokines from cellular response in this syndrome.

Key words: eumycetoma, actinomycetoma, mycetoma, interleukins.

El micetoma es un síndrome anatomoclínico no doloroso que consiste en la aparición de lesiones inflamatorias que deforman la región y afectan la piel, el tejido celular subcutáneo, la aponeurosis y el hueso.¹ Es el resultado de la implantación traumática en la piel de los agentes que lo producen y se encuentran en el suelo o los vegetales, los cuales pueden ser bacterias (actinomycetomas) y hongos (eumycetomas).² Daña casi cualquier región del cuerpo; en 70 a 75% de los casos se localiza en las extremidades inferiores, especialmente en los pies, por esto se le conoce también como “pie de Madura”. Las lesiones están constituidas por abscesos que supuran, nódulos y fístulas que drenan material purulento, y granos que son acumulaciones de filamentos de los agentes causales; su evolución es muy lenta, por lo que resulta poco invalidante durante los primeros meses o años de su aparición. Predomina en hombres, con una proporción de 4:1, excepto el micetoma por *Actinomadura madurae*, que es más común en las mujeres, en una relación de 2:1. Se manifiesta con mayor frecuencia de los 16 a los 45 años de edad.

Los estados de la República Mexicana con más casos de micetoma, en orden decreciente, son: Morelos, Guerrero, Veracruz, Michoacán, Oaxaca, Guanajuato, Puebla, Hidalgo, San Luis Potosí, Estado de México, Sinaloa y Jalisco.³

* Servicio de micología.

** Servicio de dermatología.

Hospital General Dr. Manuel Gea González, Secretaría de Salud.

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

Correspondencia: Dr. Alejandro Palma Ramos. Correo electrónico: apalma@correo.xoc.uam.mx

Recibido: junio, 2008. Aceptado: agosto, 2008.

Este artículo debe citarse como: López BAP, Arenas GR, Vega MME, Castrillón RLE, Palma RA. Identificación de células y mediadores inflamatorios en lesiones de pacientes con diagnóstico de micetoma. *Dermatol Rev Mex* 2008;52(6):247-53.

La versión completa de este artículo también está disponible en: www.revistasmedicasmexicanas.com.mx

En México son más frecuentes los actinomycetomas, con una cifra de 97.9% en comparación con 2.1% de los eumycetomas. De los primeros, el más reportado es *Nocardia*, con 86.5%, sobre todo la especie *brasiliensis*; después, *Actinomadura madurae*, con 10% (incluida *A. pelletieri*), y por último *Streptomyces somaliensis*, con 1.3%. Los eumycetomas representan 2.1%, predominan los producidos por granos negros y la especie más común es *Madurella mycetomatis*.⁴

Los principales géneros causantes del actinomycetoma son *Nocardia*, *Streptomyces* y *Actinomadura*; en los eumycetomas es *Madurella*. Estos microorganismos son saprófitos del suelo y para causar infección se introducen al organismo a través de pequeñas heridas; crecen lentamente y dan origen al micetoma.

Independientemente del origen del micetoma, siempre se forman granos en la lesión que supuran a través de fístulas internas. Las supuraciones indican, en gran medida, la reproducción del agente causal, ya que en ellas se pueden localizar granos filamentosos.⁵

Se han estudiado diferentes aspectos de la respuesta inmunitaria en pacientes con micetomas. González Ochoa, en 1962, observó que los sujetos con actinomycetoma causado por *Nocardia brasiliensis* mostraban respuesta positiva a nocardina o tuberculina, y que mientras más altos fueran los títulos de anticuerpos peor era el pronóstico.⁶

Mahgoub encontró resultados similares en 1977, cuando analizó a pacientes africanos con eumycetomas y actinomycetomas.⁷

Fahal y col.^{8,9} clasificaron la respuesta tisular del huésped en eumycetomas causados por *Madurella mycetomatis*, y según la existencia de granos negros, en: tipo I, caracterizado por la adherencia de neutrófilos a la superficie del grano que contribuyen a su desintegración; tipo II, en donde el grano fragmentado y los neutrófilos destruidos son limpiados por macrófagos y células gigantes multinucleadas; y tipo III, en el que incluso se forman granulomas epitelioides y células gigantes multinucleadas tipo Langhans sin granos. Los mecanismos de resistencia a la infección no se conocen ampliamente. Mediante el

uso de técnicas de inmunohistoquímica se ha confirmado lo que se observa con las tinciones habituales: que en la fase tipo I, la zona 1 que rodea al grano es positiva para CD 15 (neutrófilos), la zona 2 es positiva para CD68 (macrófagos) y CD3 (linfocitos T), mientras que la zona 3 contiene células CD20+ (linfocitos B). Además, se ha demostrado la presencia de IgG, IgM y complemento en la superficie de los granos y en los filamentos que los rodean. Los neutrófilos y macrófagos recluidos en la lesión por el complemento participan en el ataque al grano. El perfil en la lesión y en los ganglios linfáticos regionales está constituido principalmente por las citocinas IL-4 e IL-10 provenientes de las células Th2.¹⁰

Las células T cooperadoras específicas al antígeno pueden ser de dos tipos: Th1 y Th2, de acuerdo con las citocinas que producen y su función efectora. La diferenciación a células Th1 que generan IL-2, INF- γ y linfotóxina es estimulada por IL-12 e INF- γ , mientras que la diferenciación de células Th2 origina IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, dependientes de IL-4. El INF- γ es representativo de las citocinas del tipo Th1 y un inhibidor del crecimiento de las células Th2. La IL-10 es una citocina que muestra actividad antiinflamatoria.¹¹

OBJETIVOS

Estudiar la participación del linfocito T mediante la expresión de INF- γ , IL-4 e IL-10 en micetomas humanos. Observar cómo funcionan los mecanismos de regulación de la respuesta inflamatoria que ejercen los linfocitos T, ya sea estimulando la producción de INF- γ (Th1) o inhibiendo la de IL-4 e IL-10 (Th2) en el micetoma humano.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se hicieron biopsias de todos los pacientes con diagnóstico de micetoma en el servicio de Dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González, de enero de 1994 a marzo de 2007. En total, se tomaron muestras de nueve pacientes: cinco con micetoma por *Nocardia brasiliensis*, uno con micetoma por *Actinomyces madurae* y tres con eumicetomas (uno por *Acremonium*, otro por *Madurella mycetomatis* y otro más por *M. grisea*).

Se utilizó la técnica de fijación en parafina y se obtuvieron cuatro cortes por cada muestra: uno para tinción con hematoxilina y eosina y tres para marcaje de citocinas.

En la técnica de tinción con hematoxilina-eosina¹² se desparafina la muestra y se colorea con hematoxilina de Harris durante un minuto, tras el cual se lava. Se diferencia con alcohol-ácido, se vuelve a lavar y se vira con agua amoniacal; se lava otra vez, se colorea con eosina durante 30 segundos, se deshidrata y se monta. Los hallazgos son núcleos azules y citoplasma en color rosa o naranja.

El marcaje histoquímico se realizó con Cell and tissue staining mouse kit R&D Systems HRP-AEC SYSTEM (catalog CTS003) (Avidin-biotin y 3,3'-diaminobenzidina), proyectado para la localización de antígenos en un rango de amplio espectro de especímenes histológicos y citológicos.

Se usaron los anticuerpos anti-hINF- γ purified mouse monoclonal IgG1 (MAB304 R&D), anti-hIL-4 purified mouse monoclonal IgG2A (MAB285 R&D) y anti-hIL-10 purified mouse monoclonal IgG2B (MAB217 R&D).

RESULTADOS

Se hicieron nueve biopsias: cinco de los pacientes tenían micetoma por *Nocardia brasiliensis*, uno micetoma por *Actinomyces madurae* y tres eumicetomas (uno por *Acremonium*, otro por *Madurella mycetomatis* y uno por *M. grisea*). Se llevó a cabo la impregnación en parafina y se realizaron cuatro cortes de cada muestra, uno para la revisión del grano por la técnica de hematoxilina-eosina y tres para el marcaje histoquímico con anti-hINF- γ , anti-hIL-4 y anti-hIL-10, uno por corte, respectivamente.

Para hacer una evaluación semicuantitativa se optó por otorgar una (+) cuando la marca era pobre, (++) cuando era regular y (+++) cuando era abundante. En las figuras 1 a 5 se pueden observar ejemplos de los marcajes obtenidos en esta técnica para cada uno de los tipos de micetomas estudiados.

En el cuadro 1 se enlistan los resultados de la evaluación semicuantitativa de cada uno de los micetomas.

La figura 6 muestra que en los eumicetomas 50% de las citocinas corresponde al INF- γ , 33% a la IL-10 y 17% a la IL-4. Es posible que la IL-10 se eleve conforme aumenta el tiempo de evolución.

En los actinomicetomas el perfil de citocinas provenientes de linfocitos fue de 35% para el INF- γ , de 38% para la IL-4 y de 27% para la IL-10 (figura 6).



Figura 1. Micetoma por *Nocardia brasiliensis* marcado con anti-hINF- γ , anti-hIL-4 y anti-hIL-10, respectivamente (A, B, C), 40x.

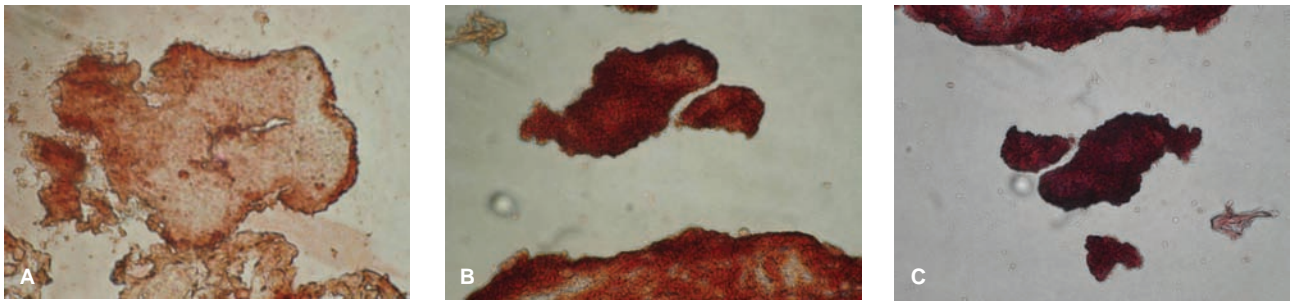


Figura 2. Micetoma por *Actinomadura madurae* marcado con anti-hINF- γ , anti-hIL-4 y anti-hIL-10, respectivamente (A, B, C), 40x.

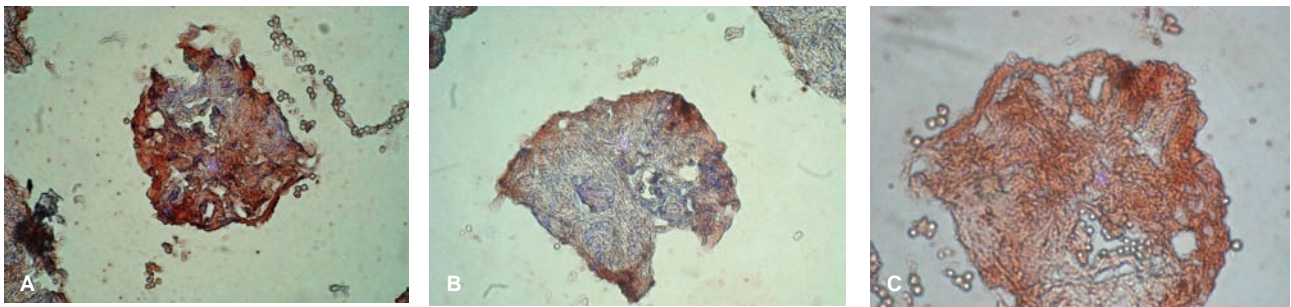


Figura 3. Micetoma por *Acremonium* marcado con anti-hINF- γ , anti-hIL-4 y anti-hIL-10, respectivamente (A, B, C), 40x.

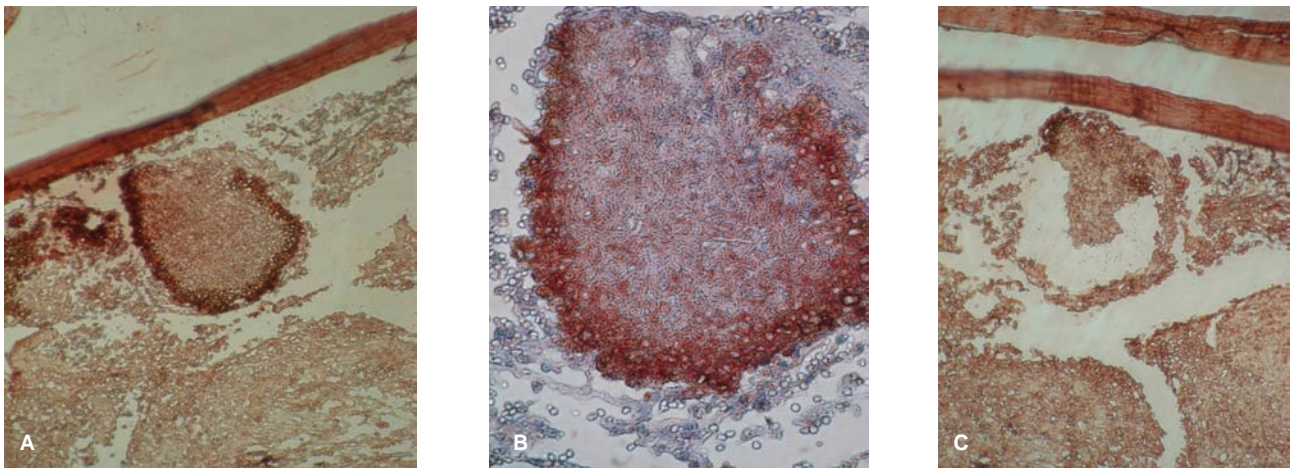


Figura 4. Micetoma por *Madurella grisea* marcado con anti-hINF- γ , anti-hIL-4 y anti-hIL-10, respectivamente (A, B, C), 40x.

Cuadro 1. Evaluación semicuantitativa de los micetomas marcados histoquímicamente con anti-hINF- γ , anti-hIL-4 y anti-hIL-10, respectivamente

Agente causal	Edad	Sexo	Tiempo de evolución (años)	IL-4	IL-10	INF- γ
<i>M. mycetomatis</i>	25	M	8	-	++	+++
<i>M. grisea</i>	50	M	5	++	+	++
<i>Acremonium</i>	52	F	6	+	++	+++
<i>A. madurae</i>	40	F	1	++	+++	Sin muestra
<i>Nocardia</i>	23	M	5	++	-	+++
<i>Nocardia</i>	17	F	3	++	++	++
<i>Nocardia</i>	29	M	1	++	-	Sin muestra
<i>Nocardia</i>	29	F	3	+++	++	+++
<i>Nocardia</i>	27	M	4	+++	+++	+


Figura 5. Micetoma por *Madurella mycetomatis* marcado con anti-hINF- γ , anti-hIL-4 y anti-hIL-10, (A, B, C), 40x.

DISCUSIÓN

En 1999, Salinas-Carmona y col.¹³ estudiaron la proliferación celular, la producción de inmunoglobulinas y algunas concentraciones de citocinas en cultivos de células mononucleares de ratones inoculados con *Nocardia brasiliensis*, en donde encontraron un marcado incremento en la producción de INF- γ y un aumento moderado en IL-4, IL-6 e IL-10. Por su parte, Méndez-Tovar y su grupo,¹⁴ probando con cultivos de células mononucleares purificadas de pacientes con actinomycetomas causados por *Nocardia brasiliensis* activadas con diferentes fracciones de proteínas purificadas, encontraron que las células de controles sanos, al ser activadas con los mismos antígenos, producían mayor cantidad de INF- γ que las purificadas, mientras que la secreción de TNF- α fue igualmente alta. La IL-4 se detectó en los cultivos de pacientes, pero no

en los de los controles. La IL-10 se encontró en bajas concentraciones en ambos cultivos.

En el estudio histológico de las muestras obtenidas en micetomas tras la inoculación con *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c, se observó un proceso inicial agudo con neutrófilos que posteriormente fue reemplazado por histiocitos epitelioides y vacuolados, linfocitos y algunas células plasmáticas. Finalmente, el infiltrado fue de neutrófilos alrededor del grano y abundantes histiocitos. Se corroboró, además, la presencia de TNF- α cerca del grano.¹⁵

En el micetoma humano, después del área de neutrófilos y macrófagos, la mayor parte de los linfocitos son CD4+ y algunos CD8+; lo que es incluso más acentuado en el caso de los eumicetomas, ya que aproximadamente 50% de las citocinas es INF- γ , y proviene, sobre todo, de células Th1 (CD4+), CD8+ y NK, estas últimas pueden

jugar un papel importante en la producción de INF- γ , como respuesta a la presencia de IL-12 e IL-15 secretadas por los macrófagos activados. El INF- γ es la molécula que activa el macrófago e inicia la producción de TNF- α , de tal manera que éste se encarga de activar y atraer a los polimorfonucleares neutrófilos hasta el sitio de infección, que es quizá la razón por la cual estas células rodean el grano en el micetoma. Se piensa que en los eumicetomas hay una relación aproximada de 19% de células CD8+ y 81% de CD4+, en donde las CD8+ también son productoras de INF- γ . Es probable que la mayor parte de las células CD4+ sean Th1 y que al avanzar el síndrome aumente la cantidad de Th2, puesto que se ha encontrado que casi 50% de las citocinas restantes son IL-4 e IL-10 (figura 6).

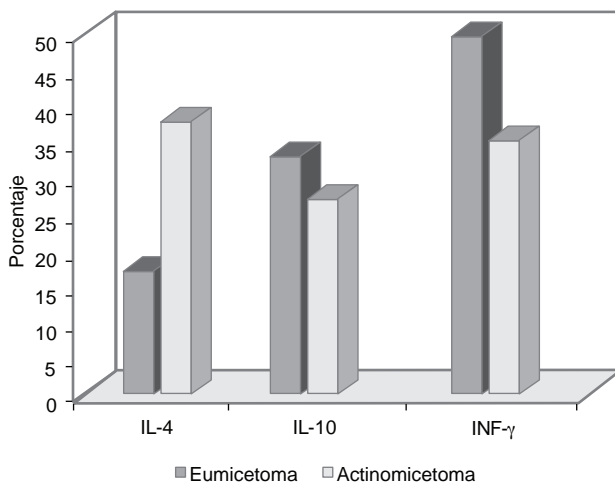


Figura 6. Relación de citocinas en eumicetoma y actinomicetoma humano, en donde el INF- γ proviene de células CD8+ y CD4+ Th1, y las IL-4 e IL-10 provenientes del linfocito CD4+ Th2.

En el caso de los actinomicetomas, la relación entre las células CD8+ y las CD4+ es 15 y 85%, respectivamente.¹⁶ Esto puede explicar por qué en este caso se encuentran el INF- γ , la IL-4 y la IL-10 en proporciones casi iguales, manteniendo un equilibrio en la estimulación y la inhibición de la inflamación. Se piensa que la IL-10 induce la persistencia de algunas infecciones intracelulares.

La estimulación a las células CD 8+ puede estar dada por los péptidos liberados del microorganismo por células presentadoras profesionales junto con su complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I (presentación cruzada). La activación de las células Th2 es inducida por las mismas células presentadoras profesionales, pero por

medio de la unión del antígeno a su complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, con la probable participación de la IL-4 en las etapas crónicas de la infección.

CONCLUSIÓN

En este estudio se encontró que en la respuesta inmunológica de los micetomas participan principalmente los linfocitos CD4 + Th1 y TCD8+ (productores de INF- γ), y que posteriormente es controlada por los linfocitos CD4+ Th2 (productores de IL-4 e IL-10). Esto podría explicar la regulación entre las citocinas estimuladoras y las inhibidoras de la respuesta celular existente en este síndrome.

REFERENCIAS

- González OA. Mycetoma. In: Cañizares O, editor. Clinical tropical Dermatology. Oxford: Blackwell Scientific, 1975;pp:24-29.
- Magaña M. Mycetoma. Int J Dermatol 1984;23:221-36.
- López Martínez R, Méndez Tovar LJ, La Valle P, Welsh O, Saul A, Macotela Ruiz E. Epidemiología del micetoma en México: Estudio de 2,105 casos. Gac Med Mex 1992;128(4):477-81.
- Padilla C, Novales J, Juárez V, Flores A. Minimicetoma. Presentación de un caso. Rev Cent Dermatol Pascua 2004;13:41-44.
- Lavalle P. Micetomas por *Streptomyces* en América. Dermatología Ibero Lat-Amer 1972;3:379-89.
- González-Ochoa A, Shibayama H, Félix D, Anaya M. Immunological aspects of actinomycotic micetoma and nocardiosis. Proceedings of XII International Congress Dermatology of Washington, DC. 1962;542-51.
- Mahgoub ES, Gumma SA, El Hassan AM. Immunological status of micetoma patients. Bull Soc Pathol Exot 1977;70:48-53.
- Fahal AH, El-Hassan AM, Veress B. Cell phenotypes, immunoglobulins and complement in lesions of eumycetoma caused by *Madurella mycetomatis*. Sud J Dermatol 2006;4:2-5.
- 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;33:103-6.
- Fahal AH. Mycetoma: a thorn in the flesh. Trans R Soc Trop Med Hyg 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 *Staphylococcus aureus* infection through regulation of gamma interferon. Infect Immun 2000;68:2424-30.
- Cormack HD. Histología de HAM. 9ª ed. México: Harla, 1988;pp:19-23.
- Salinas-Carmona MC, Torres-López E, Ramos E, Ramos AI, Licon-Trujillo A, González-Spencer D. Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomicetoma in BALB/c mice. Infect Immun 1999;67:2428-32.

14. Méndez-Tovar LJ, Mondragón GR, Vega LF, Hazel MD, et al. Cytokine production and lymphocyte proliferation in patients with *Nocardia brasiliensis* actinomycetoma. *Mycopathologia* 2004;158:407-14.
15. Cuevas-Moreno MV. Vasculitis cutánea e identificación de células y mediadores inflamatorios (TNF- α) en lesiones de micetoma provocadas por inoculación de *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c. Tesis Médico Cirujano. México: UNAM, 2006.
16. Palma Ramos A, Castrillón Rivera LE, Pizaña Cureño A, Vega Memije ME, et al. Subpoblaciones de linfocitos T en el micetoma. *Dermatol Rev Mex* 2007;51:212-8.



ACADEMIA MEXICANA DE DERMATOLOGÍA, A.C.

A G E N D A 2 0 0 8

DIC

Sesión cultural
Sede: Museo del Carmen,
México, DF
Fecha por confirmar

INFORMES: Filadelfia 119 Penthouse, colonia Nápoles, 03810, México, DF.
Tel: 5682-8963, 5682-2545, 5543-5354