

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
DIVISION CIENDAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
LICENCIATURA QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA



Casa abierta al tiempo

PROYECTO

**PRESENCIA DE INTERLEUCINA-17 A EN
ACTINOMICETOMAS**

PRESENTA

GABRIELA ORTIZ DELGADILLO

MATRICULA: 2143074811

**DIRECCIÓN: Calle Tizapan #305, Ampl. José Vicente Villada,
Nezahualcoyotl, Estado de México.**

Fecha Inicio: 5 de noviembre 2018

Fecha término: 5 de mayo 2019

ASESORES

M en C. ALEJANDRO PALMA RAMOS

M en C. FELIPE MENDOZA PÉREZ

Fecha entrega: Octubre 2019

**DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
LICENCIATURA QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL
Presencia de Interleucina – 17 A en Actinomicetomas

PERTENECE AL PROYECTO GENÉRICO
Evaluación de productos relacionados con la salud

ALUMNA: Gabriela Ortiz Delgadillo

Matricula: 2143074811

DIRECCIÓN: Calle Tizapan #305, Ampl. José Vicente Villada,
Nezahualcoyotl, Estado de México. Cel. 55-37-08-61-75

ASESORES: M. en C. Alejandro Palma Ramos
M en C. Felipe Mendoza Pérez

Fecha de inicio y terminación: 5 noviembre de 2018 – 5 de mayo 2019

INDICE

1. INTRODUCCION	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 MICETOMA	2
2.2 EPIDEMIOLOGÍA	2
2.3 CUADRO CLINICO	3
2.4 ACTINOMICETOMA POR <i>Nocardia brasiliensis</i>	3
2.5. ACTINOMICETOMA POR <i>Actinomadura madurae</i>	4
2.6 RESPUESTA INMUNE CONTRA ACTINOMICETOMAS	4
2.7 INMUNIDAD ADQUIRIDA CONTRA ACTINOMICETOMAS.....	4
2.8 INFLAMACIÓN EN MICETOMAS	5
2.9 LINFOCITOS T COLABORADORES	5
2.10 CELULAS COLABORADORAS (TH17).....	5
2.11 INTERLEUCINA-17 A	6
3. JUSTIFICACIÓN.....	7
4. OBJETIVOS	7
4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	7
5. METODOLOGIA	7
5.1 PROCESO DE MUESTRAS	7
5.1.1 Desparafinación.....	7
5.1.2 Tinción Hematoxilina – Eosina	8
5.1.3 Marcaje <i>In situ</i>	8
6. RESULTADOS.....	10
6.1 Tinción con Hematoxilina - Eosina.....	10
6.2 Marcaje <i>In situ</i>	11
6.2.1 Estudio de actinomicetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i> :	11
6.1.2 Estudio de actinomicetoma por <i>Actinomadura madurae</i> :	13
7. DISCUSIÓN.....	14
8. CONCLUSIÓN	15
9. BIBLIOGRAFÍA.....	15
10. RESUMEN.....	19
10.1 INTRODUCCIÓN.....	19

10.2 OBJETIVOS	20
10.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
10.3 CONCLUSIÓN	20
10.4 BIBLIOGRAFÍA	20

1. INTRODUCCION

El micetoma es una enfermedad inflamatoria crónica, granulomatosa, subcutánea causada por hongos verdaderos (eumicetomas) o bacterias filamentosas (actinomicetomas) (Fahal AH, 2004). Es de gran importancia en México, tanto por su frecuencia como por la gravedad de algunos casos. Hasta el 2012, se han registrado 3,933 casos en los últimos 54 años; de los cuales el 96.52% corresponde a micetomas causados por bacterias filamentosas y el principal agente etiológico es *Nocardia brasiliensis* (65.58%) seguido de *Actinomadura madurae* (7.93%) (López Martínez, et al., 2013).

Se ha demostrado que en el actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* se encuentran altos niveles de INF- γ y principal citocina relacionada con la respuesta TH1, que además está asociada con la activación de macrófagos y sus mecanismos microbicidas. Por otro lado, se encontraron altos niveles de IL-4, IL-6, e IL-10, las cuales se relacionaron con la respuesta de TH2 y la inducción de la respuesta de anticuerpos (Liñan, 2010). Sin embargo, se ha descubierto que no sólo la respuesta de TH1 y TH2 son las únicas implicadas en la respuesta inflamatoria de este padecimiento, sino que también TH17 está relacionada.

Las TH17 son el tercer tipo de células colaboradoras y desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra bacterias y hongos extracelulares, que no son eliminados de manera eficiente por las respuestas TH1 y TH2 (Korn, Oukka, Kuchroo, & Bettelli, 2007). Asimismo, se ha descrito para ellas un efecto proinflamatorio que les permite hacer de puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Además de ser secretoras de IL-17 (Hernandez, 2009).

La IL-17 es una citocina pro-inflamatoria que ha sido relacionada con procesos inflamatorios crónicos (o bien, que presentan una reacción de hipersensibilidad tardía) como infecciones bacterianas y micóticas (Liñan, 2010) (Moissec & Kolls, 2012). La IL-17A es la primera de una familia de citocinas (familia de la IL-17). Actualmente se conocen 6 moléculas diferentes que se nombran desde IL-17A a IL-17F (Hernandez, 2009). Sin embargo, sólo IL-17A e IL-17F son homólogos estructuralmente y las dos emplean el mismo receptor IL-17RA. Tanto IL-17A como IL-17F promueven a su vez, la secreción de G-CSF (Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos), otra importante citocina para la estimulación de neutrófilos y, por lo tanto, un factor importante dentro de un proceso inflamatorio (Korn, et al., 2007).

Actualmente existe evidencia de la presencia de IL-17A en la inflamación en actinomicetomas causados por *N. brasiliensis* (Liñan, 2010). Sin embargo, estos estudios se han llevado a cabo en ratones. Por otro lado, no se tiene evidencia de la implicación de la IL-17A en actinomicetomas por *Actinomadura madurae*. Por lo que en este trabajo se estudió la presencia de IL-17A en actinomicetomas causados por

N.brasiliensis y *A. madurae* en biopsias de pacientes con diagnóstico de micetoma, utilizando una técnica de hibridación *In situ*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 MICETOMA

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 elimina pus y granos, constituidos por filamentos. Los agentes causales son de origen exógeno y pueden ser hongos (eumicetoma) o bacterias (actinomicetoma) (Barroeta S, 1987).

El primer caso fue descrito en el Arharva Veda en India hace siglos. La primera observación científica corresponde a Engelbert Kaempfer, un médico y viajero alemán que en 1694 hizo una descripción de esta enfermedad que observó en Malabar, India, como parte de su tesis doctoral en Holanda. En 1842, John McGill, un cirujano inglés, observó estos padecimientos en Madrás, en la región de Madura en India. En 1846, J.Godfrey, un cirujano, también en Madrás, hizo la primera caracterización en la literatura médica y la publicó en *The Lancet* con el título *Diseases of the foot not hitherto described* y la denominó “*morbis tuberculosis pedis*”. En 1846, L. Colebrook le llamó “pie de Madura”. En 1860, Minas describió lesiones en la mano y, en 1855, Ballingali, en los huesos. En 1860, Henry Vandyke Carter acuñó el término “micetoma”, constató la presencia de granos y los señaló como partículas fúngicas; en 1874, publicó sus observaciones en una monografía, *On mycetoma or the fungus disease of India*. En ese mismo año, Ch. McQuestin señaló la existencia de micetomas en América, en Sonora, México. En 1893, J. E. Bocarro propuso el mecanismo de inoculación traumática (Arenas Guzmán, 2014).

En 1894, R. Boyce y N. F. Surveyor observaron que, además de los hongos, los actinomicetos también eran una causa de la infección (Arenas Guzmán, 2014).

En 1911 Ricardo Cicero estudió por primera vez casos de micetomas en México. Mientras en 1928, M. Langeron también aplicó el término a casos producidos por *Actinomyces* y *Nocardia* (Arenas Guzmán, 2014).

La separación en eumicetomas y actinomicetomas fue sugerida por E. Pinoy en 1913, luego por Albert John Chalmers y el capitán R. G. Archivald en 1916 y más tarde por Pedro Lavalle en 1961 (Arenas Guzmán, 2014).

2.2 EPIDEMIOLOGÍA

En México hasta el 2012 se reportaron 3,933 casos, con un promedio de 73 casos nuevos/año. De los 3,860 que se registraron el 75.6% corresponde a hombres y el 24.4% a mujeres. Las ocupaciones en las que se presentan casos de micetoma son

muy diversas. El mayor número corresponde a campesinos (58.41%), seguido de amas de casa de zonas rurales. Otras ocupaciones en las que se observa un número relevante de micetomas son: obreros, estudiantes y albañiles, todos ellos habitantes de zonas rurales. Los estados con mayores casuísticas son: Jalisco, Morelos, Nuevo León, Guerrero, Veracruz y Michoacán.

De los micetomas reportados en México, el 96.52% son actinomicetomas mientras que el eumicetoma se presenta en un 3.48%. Entre los actinomicetomas *Nocardia brasiliensis* es la bacteria más frecuente con un 65.58% seguida de *Actinomadura madurae* 7.93%. En el caso de los eumicetomas *Madurella* es el más reportado. Las especies más frecuentes son *M.grisae* y *M.mycetomatis* (López Martínez, et al., 2013).

2.3 CUADRO CLINICO

La presentación clínica del micetoma es casi la misma, independientemente del agente causal. Sin embargo, el cuadro clínico del actinomicetoma es de más rápida progresión que la del eumicetoma. Por lo general, el actinomicetoma presenta una lesión más de tipo inflamatorio, generalmente acompañada de infecciones secundarias; es más destructivo e invade los huesos desde etapas muy tempranas de la infección. Por el contrario, el eumicetoma es una lesión de crecimiento lento, que presenta márgenes muy bien definidos y permanece encapsulado por largos períodos. (Serrano & Sandoval, 2003).

El cuadro clínico característico se presenta como una masa de tejido blando similar a un tumor de crecimiento lento que aumenta gradualmente de tamaño. Con el tiempo, se desarrollan múltiples senos paranasales, y eventualmente, drenan la secreción purulenta y seropurulenta que contiene granos (Ahmed et al., 2007) (Hassan MA & Fahal AH, 2004). Estos granos que son característicos del micetoma son de diferentes colores, tamaños y consistencia dependiendo de los organismos causantes. En el caso de *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura madurae* forman granos de color blancos-amarillentos (Arenas Guzmán, 2014).

2.4 ACTINOMICETOMA POR *Nocardia brasiliensis*

En México hasta el 2004 se han reportado 1844 casos de actinomicetomas, en donde *Nocardia brasiliensis* (*N.brasiliensis*) es el principal agente etiológico (Serrano, H, & Beaman Blaine, 2007).

N. brasiliensis, es una especie perteneciente al grupo de los actinomicetos. Este patógeno intracelular es una bacteria aerobia, de tipo inmóvil, Gram positiva, cuyo hábitat natural es generalmente el suelo, sobre todo tierras ricas en materia orgánica (Salinas Carmona & C., 2000). Las infecciones causadas por *N. brasiliensis* ocurren de manera accidental por inoculación del microorganismo en la piel y el tejido subcutáneo (Boiron, et al., 1998). Su diagnóstico se lleva a cabo por la presencia de microcolonias

o gránulos, el cual es confirmado por un cultivo microbiológico o por serotipificación (Salinas Carmona & C., 2000).

2.5. ACTINOMICETOMA POR *Actinomadura madurae*

Como se cita en el artículo de Padilla Desgarenes y Guardado Díaz el primer caso de *Actinomadura* fue descrito en África por Vincent, en 1884. El hábitat natural de *Actinomadura madurae* es la tierra y los vegetales, cuando se produce un traumatismo que ocasiona pérdida de continuidad de la piel, se facilita el ingreso del agente causal al organismo.

En los actinomicetomas por *Actinomadura madurae* pueden observarse granos grandes que miden de 1 a 10 mm, sus filamentos se tiñen intensamente con hematoxilina y se distinguen con claridad. Su forma es cartográfica o polilobulada, con un borde eosinófilo (pseudoclavas) que puede faltar en algunas áreas. La reacción inflamatoria que rodea a los granos es menos intensa que la observada en los actinomicetomas provocados por *Nocardia* (Palma Ramos, Castrillón Rivera, Padilla Desgarenes, & Reyes Fuentes, 2005).

2.6 RESPUESTA INMUNE CONTRA ACTINOMICETOMAS

Una vez que sucede la inoculación de bacterias como *N. brasiliensis*, sus proteínas y las moléculas complejas de su pared bacteriana, funcionan como antígenos induciendo una fuerte respuesta inmune por parte del huésped. En etapas tempranas de la infección la respuesta inmune reclutará fagocitos y polimorfonucleares. En etapas posteriores se infiltrarán linfocitos y macrófagos al sitio de infección, favoreciendo el proceso de inflamación y fagocitosis de microorganismos. Algunas veces, es suficiente esta respuesta para eliminar a la bacteria; sin embargo, en otras ocasiones, el microorganismo logra sobrevivir en el interior de los macrófagos, multiplicarse y desarrollar así una infección crónica. (Serrano & Sandoval, 2003) (Salinas Carmona, et al., 1999).

2.7 INMUNIDAD ADQUIRIDA CONTRA ACTINOMICETOMAS

Las infecciones causadas por bacterias intracelulares, como *N. brasiliensis* tienden a inducir una respuesta inmune mediada por células. En este tipo de reacción, es de importancia el papel de las células TCD4⁺, en especial las productoras de IFN- γ , el cual se encarga de la activación de los macrófagos para la eliminación de los patógenos fagocitados (Kindt, G., & Osborne, 2007). Sin embargo, *N. brasiliensis* tiene la capacidad de evadir los mecanismos de defensa del hospedero, escapando del fagolisosoma e inclusive resistiendo a los ataques oxidativos. De esta manera, se podría estar causando la activación crónica de las células TCD4⁺ (Kindt, G., & Osborne, 2007).

2.8 INFLAMACIÓN EN MICETOMAS

En general, los granos están rodeados por tres zonas de células inflamatorias. La zona más interna, la zona 1, se compone principalmente de neutrófilos (Mahgoub ES & Murray LG, 1973). La siguiente zona, la zona 2 consiste principalmente en macrófagos y la zona más externa, la zona 3, contiene linfocitos y células plasmáticas (Hassan, Ahmed, Ismail, & Veress, 2001). Aunque la reacción inflamatoria entre el eumicetoma y el actinomicetoma es similar, existen algunas diferencias. Se ha encontrado que en la reacción inflamatoria por actinomicetomas participan 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) (Lopez, 2008). Sin embargo, el número de linfocitos CD8 +y macrófagos fue mayor en las lesiones de actinomicetoma que en las lesiones de eumicetoma (Guimaraes, Castro, & Sotto, 2003). Otra diferencia es la respuesta de Th17, la cual parece jugar un papel importante en la implantación de hongos subcutáneos, la micosis cromoblastomicosis (Silva, Criado, & Nunes, 2014) y en el Micetoma experimental por *Nocardia brasiliensis* en ratones (Rosas et al., 2012).

2.9 LINFOCITOS T COLABORADORES

Durante la década de 1980 se profundizó en el conocimiento de la funcionalidad de los linfocitos T y se identificaron 2 tipos de respuestas colaboradoras: la TH1 (inmunidad celular o retardada) y la TH2 (inmunidad humoral). Las TH1 son altamente efectivas en la eliminación de patógenos intracelulares y las TH2 son de gran importancia en la eliminación de microorganismos extracelulares y parásitos (Abbas, Murphy, & Sher, 1996). Esta división en 2 subtipos se basó en el panel de citocinas que éstos eran capaces de secretar una vez activados, y con las que modulaban a diversos tipos celulares. Se denominó TH1 a los linfocitos secretores IFN- γ e IL-2, y se denominó TH2 a los linfocitos que liberan IL-4 e IL-13 (Mosmann & Coffman, 1989).

La diferenciación en TH1 o TH2 a partir de los linfocitos quiescentes se determina en la sinapsis inmunitaria, en función de las citocinas que están presentes y que funcionan como terceras señales durante el proceso de activación. La IL-12 promueve la transformación en células TH1 y la IL-4 promueve la transformación en células TH2 (Lanzavecchia & Sallusto, 2001).

2.10 CELULAS COLABORADORAS (TH17)

La existencia de un tercer grupo de células reguladoras se dedujo tras comprobar que las células T tratadas con péptidos microbianos en presencia de *Borrelia burgdorferi* (el agente de la enfermedad de Lyme) producían IL-17; pero a esta citocina no la elaboran las TH1 ni las TH2, lo que implica la existencia de un nuevo subgrupo de linfocitos T (CD4+) que secretan IL-17 y que coordinan la respuesta inmune de un modo diferente a las TH1 o a las TH2 (Infante Duarte, F. Horton, Byrne, & Kamradt, 2000).

Las TH17 son el tercer tipo de células colaboradoras y desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra bacterias y hongos extracelulares, que no son eliminados de manera eficiente por las respuestas Th1 y Th2 (Thomas Korn et al., 2007). Asimismo, se ha descrito para ellas un efecto proinflamatorio que les permite hacer de puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Las citocinas implicadas en el control de la actividad TH17 son la IL-23, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y la IL-6. El TGF- β y la IL-6 promueven la diferenciación de los linfocitos quiescentes en TH17 y, una vez diferenciados, la citocina que induce la proliferación de estas células es la IL-23 (Hernandez, 2009)

Una vez diferenciadas las células TH17 ante ciertos estímulos son capaces de producir IL-17 la cual participa en la inmunidad protectora contra diversas infecciones.

2.11 INTERLEUCINA-17 A

La IL-17 es la primera de una familia de citocinas (familia de la IL-17). Actualmente se conocen 6 moléculas diferentes que se nombran desde IL-17A a IL-17F. La IL-17A es la más importante y por eso es a la que se denomina genéricamente como IL-17. El receptor para la IL-17A está presente en una amplia variedad de células y tejidos, tanto del sistema inmune (linfocitos B y T, monocitos, células de estirpe mieloide, estroma de médula ósea, etc.) como extrínsecas (epiteliales, fibroblastos, endotelio, etc.). Hay varios receptores similares al de la IL-17 aunque su función todavía no está bien definida (Hernandez, 2009)

La IL-17A, al igual que la IL-17H, actúa sobre un amplio panel de células, y las estimula a secretar potentes mediadores de la inflamación como IL-1, TNF- α (*tumor necrosis factor alpha* 'factor de necrosis tumoral alfa'), IL-6, IL-8, prostaglandina E2, quimiocinas y metaloproteasas. Además de actuar sobre las células del tejido, la IL-17 es esencial en el reclutamiento, activación y migración de otras células del sistema inmune (Kolls, 2004).

Tanto IL-17A como IL-17F son producidos por una variedad de tipos de células, incluidos subconjuntos de células T CD4⁺, células T CD8⁺, células $\gamma\delta$ -T, células NK y neutrófilos. La producción de IL-17 también se ha asociado con células T CD4⁺ de memoria y recientemente con el nuevo subconjunto de células T efectoras, Células Th17. IL-17A e IL-17F tienen propiedades proinflamatorias y actúan sobre una amplia gama de tipos de células para inducir la expresión de citocinas (IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF), quimiocinas (CXCL1, CXCL10) y metaloproteinasas. IL-17A e IL-17F también son citocinas clave para el reclutamiento, activación y migración de neutrófilos (Korn, Oukka, Kuchroo, & Bettelli, 2007).

3. JUSTIFICACIÓN

La respuesta inmune es un factor importante para la eliminación de organismos. Actualmente se sabe poco sobre la implicación de la IL-17 A en la respuesta inmune durante la presencia de micetomas, buscamos aquí investigar el papel de esta citocina en cortes histológicos de pacientes con micetoma utilizando un método de hibridación *in situ*.

4. OBJETIVOS

Demostrar la presencia de la IL-17 A por hibridación *in situ* en pacientes con diagnóstico de micetoma por *Nocardia brasiliensis* o *Actinomadura madurae*.

4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Demostrar la presencia de la IL-17A en pacientes con diagnóstico de micetoma por *Nocardia brasiliensis*.

Demostrar la presencia de IL-17A en pacientes con diagnóstico de micetoma por *Actinomadura madurae*.

Comparar la presencia de IL-17A en pacientes con *N. brasiliensis*, o *A. madurae*.

5. METODOLOGIA

Se obtuvieron 9 biopsias de pacientes con diagnóstico de micetoma, 7 por *Nocardia brasiliensis* y 2 por *Actinomadura madurae* del Hospital Dr. Manuel Gea González. A los cuales se les efectuaron dos cortes por cada una.

A un corte se le efectuó la técnica de Hematoxilina Eosina y al segundo el marcaje *In situ*.

5.1 PROCESO DE MUESTRAS

5.1.1 Desparafinación

Sumergir el portaobjetos en las siguientes soluciones:

1. Xilol por 10 min
2. Xilol- alcohol absoluto 5 min
3. Alcohol absoluto 5 min
4. Alcohol 96% 5 min
5. Alcohol 70% 5 min
6. Agua bidestilada 5 min

5.1.2 Tinción Hematoxilina – Eosina

1. Coloración con Hematoxilina de Harris durante 1 min
2. Se lavó en agua de la llave
3. Se diferenció en alcohol-ácido
4. Se lavó en agua de la llave
5. Se viró en agua amoniacal
6. Se lavó 3 veces en agua destilada
7. Coloración con Eosina durante 30 segundos
8. Alcohol de 96, 3 min (3 veces)
9. Alcohol absoluto 3 min
10. Alcohol absoluto-xilol 5 min
11. Xilol 10 min
12. Se montó en resina sintética

5.1.3 Marcaje *In situ*

Marcaje *In situ* utilizando el kit HRP-AEC CTS003 System, Mouse Kit:

1. Se cubrió la muestra con 1-3 gotas del reactivo de bloqueo de peroxidasa durante 5 min.
2. Se enjuagó la muestra con buffer y luego se lavó en buffer durante 5 min.
3. Se incubó la muestra con 1-3 gotas de reactivo de bloqueo de suero G durante 15 min. Se drenó el portaobjetos y limpió cuidadosamente el exceso de reactivo de bloqueo del suero antes de continuar con el siguiente paso.
4. Se incubó la muestra con 1-3 gotas de reactivo de bloqueo Avidin durante 15 min.
5. Se enjuagó la muestra con buffer, se drenó el portaobjetos y limpió con cuidado el exceso de buffer antes del siguiente paso.
6. Se incubó la muestra con 1-3 gotas de reactivo de bloqueo de biotina durante 15 min.
7. Se enjuagó con buffer, se drenó los portaobjetos y limpió cuidadosamente el exceso de buffer antes del siguiente paso.
8. Se incubó la muestra con anticuerpo primario (anti IL-17 G-4 humana (IgG₂₈) hecho en ratón por Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:50 por 30 min a 37°C. Posteriormente se dejó por 24 h a 4-8 °C.
9. Se enjuagó la muestra con buffer. Se lavó 3 veces en buffer durante 15 min.
10. Se drenó el portaobjetos y limpió cuidadosamente el exceso de buffer antes del siguiente paso.

11. Se incubó la muestra con 1-3 gotas de anticuerpo secundario biotinilado CTS003 (part. 865001) durante 30 min a 37°C. Luego se pasó a refrigerar por 1h a 4-8°C.
12. Se repitió el paso 9.
13. Se drenó el portaobjetos y limpió cuidadosamente el exceso de buffer antes del siguiente paso.
14. Se incubó la muestra con 1-3 gotas de HSS-HRP durante 30 min a 37°C.
15. Se enjuagó con buffer. Se lavó 3 veces en buffer durante 2 min.
16. Se drenó el portaobjetos y limpió cuidadosamente el exceso de buffer antes del siguiente paso.
17. Se agregó 10 µL de AEC en 90 µL de buffer de cromógeno.
18. Se agregó 1-5 gotas de solución de cromógeno AEC recién preparada para cubrir toda la muestra y se incubó durante 20 min.
19. Se enjuagó con agua destilada. Se lavó en agua destilada fresca durante 5 min.
20. Se agregó 1-3 gotas de hematoxilina de Mayer's y se dejó reposar por 30 min.
21. Se lavó con agua de llave por 2 min.
22. Se agregó 1-2 gotas del medio de montaje acuoso (Mountant, PermaFluor).

6. RESULTADOS

6.1 Tinción con Hematoxilina - Eosina.

Los cortes de actinomicetoma causados por *N. brasiliensis* y *A. madurae* teñidos por hematoxilina – eosina generaron la siguiente información:

En la figura 1 se muestra el grano de *N. brasiliensis* el cual presenta una forma bilobulada, característica de los micetomas por este agente causal. En la figura 2 se observa el grano de *A. madurae* con contorno cartográfico debido a que es más afín a la hematoxilina. Además, como se observa en la figura 3 y 4, ambos cortes muestran las 3 zonas del grano en el micetoma como se describió anteriormente.

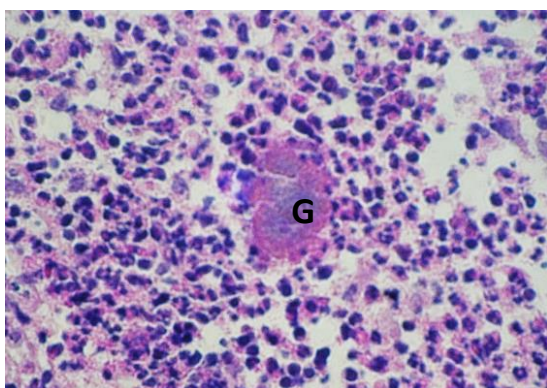


Fig. 1. Grano (G) de *N.brasiliensis* teñido con hematoxilina – eosina. Se muestra el grano (G) 40x.

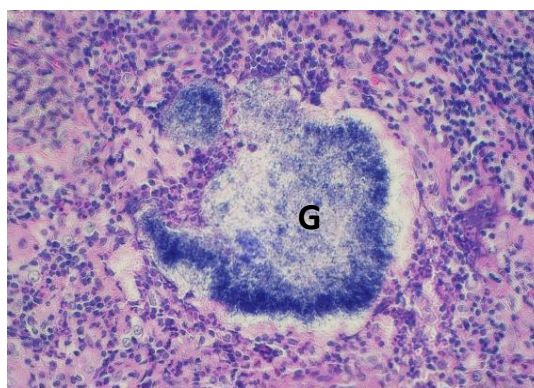


Fig. 2. Grano (G) de *A. madurae* teñido con hematoxilina – eosina. Se muestra el grano (G) 40x.

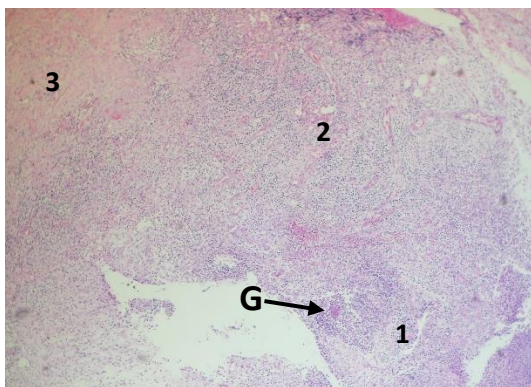


Fig. 3. Grano (G) de *N.brasiliensis* teñido con hematoxilina – eosina. Se muestran las zonas del micetoma, zona 1, zona 2 y zona 3 alrededor del grano (G) 5x.

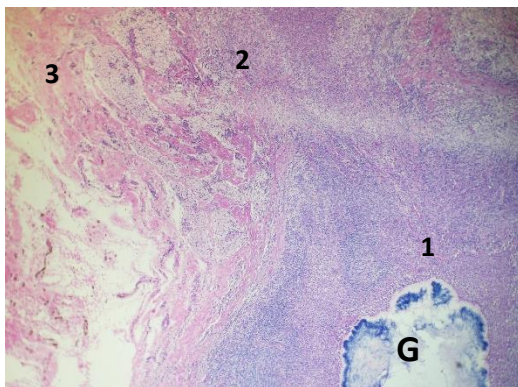


Fig. 4. Grano (G) de *A. madurae* teñido con hematoxilina – eosina. Se muestran las zonas del micetoma, zona 1, zona 2 y zona 3 alrededor del grano (G) 5x.

6.2 Marcaje *In situ*

Para demostrar la presencia de la IL-17 A en cortes histológicos de pacientes diagnosticados con micetomas por actinomicetos se utilizó como anticuerpo primario el anti IL-17, G-4 humana (IgG₂₈) hecho en ratón y como anticuerpo secundario el anti-ratón (part. 865001) del Kit Cell & Tissue Staining, con una visualización basada en la enzima de conversión de un sustrato cromógeno 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) que da un color rojo al precipitar con peroxidasa de rábano (HRP) en el sitio de localización del antígeno. La alta sensibilidad del sistema es adquirida por el uso de un anticuerpo secundario biotinilado y un conjugado de streptavidina HRP(HSS-HRP).

6.2.1 Estudio de actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*:

En todos los pacientes se observó presencia de células productoras de IL-17A en las 3 zonas que rodean al grano de micetoma. Sin embargo, como se puede ver en la figura 6 y 8, sólo dos pacientes presentaron estas células de forma abundante en la zona II. En 6 de los casos se observó escasa cantidad de estas células en las 3 zonas (figura 5, 7, 9, 10 y 11). En el paciente 6 se logró observar presencia de IL-17A dentro del grano (figura 10).

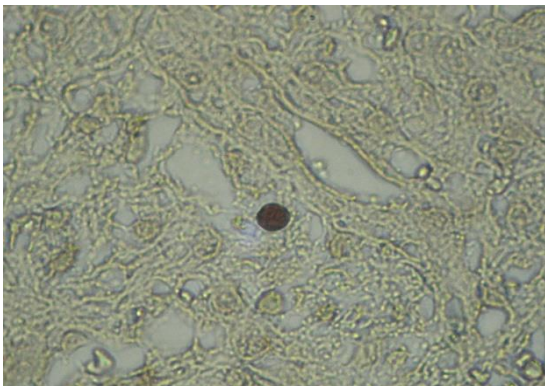


Fig. 5. Marcaje *in situ* de actinomicetoma por *N. brasiliensis* de paciente 1. Se muestra célula productora de IL-17A. 40 x.

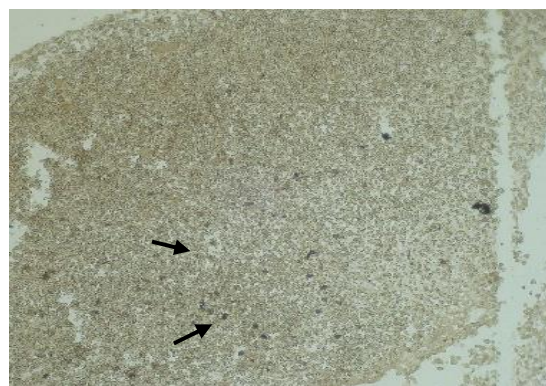


Fig. 6. Marcaje *in situ* de actinomicetoma por *N. brasiliensis* de paciente 2. Se muestran células productoras de IL-17A. 10 x.

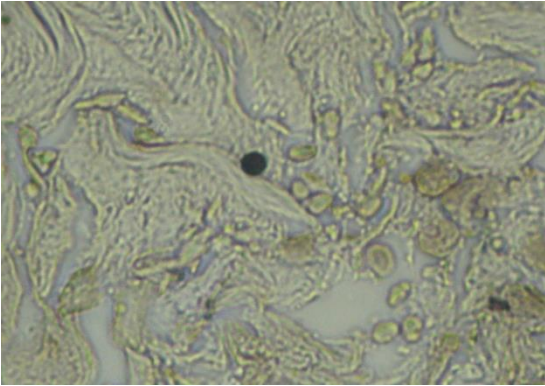


Fig. 7. Marcaje *in situ* de actinomictoma por *N. brasiliensis* de paciente 3. Se muestra célula productora de IL-17A. 40 x.

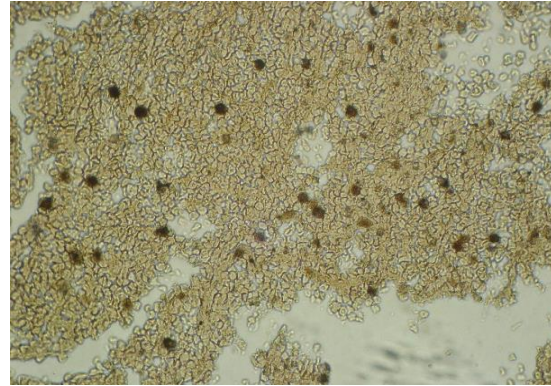


Fig. 8. Marcaje *in situ* de actinomictoma por *N. brasiliensis* paciente 4. Se muestran células productoras de IL-17A. 40 x.

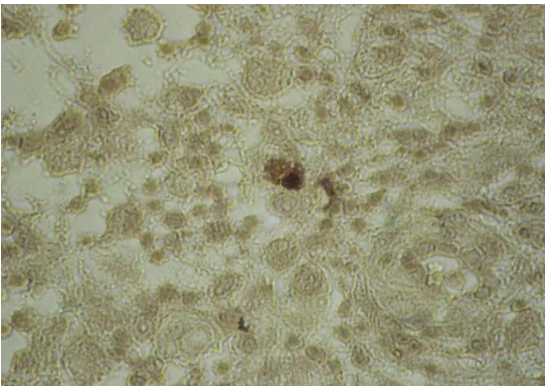


Fig. 9. Marcaje *in situ* de actinomictoma por *N. brasiliensis* de paciente 5. Se muestra célula productora de IL-17A. 40 x.



Fig. 10. Marcaje *in situ* de actinomictoma por *N. brasiliensis* de paciente 6. Se observa célula productora de IL-17A y grano (G) de agente causal. Muestra observada a 10 x.

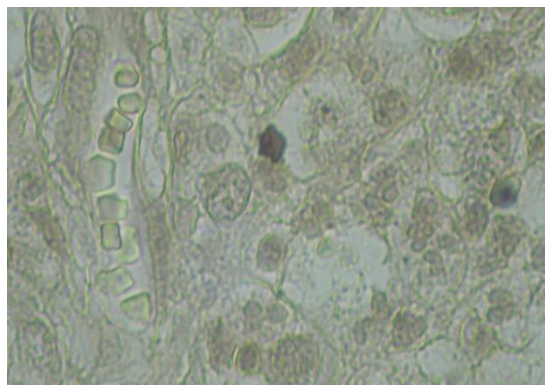


Fig. 11. Marcaje *in situ* de actinomictoma por *N. brasiliensis* de paciente 7. Se muestra célula productora de IL-17A. 40 x.

6.1.2 Estudio de actinomicetoma por *Actinomadura madurae*:

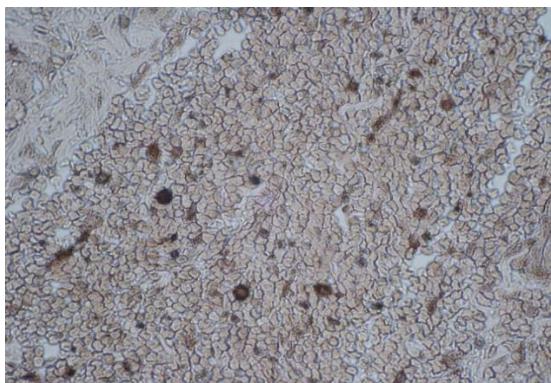


Fig. 12. Marcaje *in situ* de actinomicetoma por *A.madurae* de paciente 7. Se muestran células productoras de IL-17A. 40 x.



Fig. 13. Marcaje *in situ* de actinomicetoma por *A.madurae* de paciente 7. Se muestran células productoras de IL-17A y grano (G) de agente causal. 10 x.

Para hacer una evaluación semicuantitativa se optó por otorgar una cruz (+) cuando la presencia de células productoras de IL-17A era poca, (++) cuando era regular y (+++) cuando era abundante (Tabla 1).

Tabla. 1. Evaluación semicuantitativa de la presencia de células productoras de IL-17A en actinomicetomas por *N. brasiliensis* y *A. madurae*.

Paciente	Agente causal	Células productoras de IL-17A
1	<i>Nocardia brasiliensis</i>	+
2	<i>Nocardia brasiliensis</i>	+++
3	<i>Nocardia brasiliensis</i>	+
4	<i>Nocardia brasiliensis</i>	+++
5	<i>Nocardia brasiliensis</i>	+
6	<i>Nocardia brasiliensis</i>	+
7	<i>Nocardia brasiliensis</i>	+
8	<i>Actinomadura madurae</i>	+++
9	<i>Actinomadura madurae</i>	+++

El 29% de los actinomicetomas por *N.brasiliensis* presentó abundante número de células productoras de IL-17 A en la zona II y el 71% fue de baja a escasa cantidad de células productoras de IL-17 A.

En actinomicetomas por *A.madurae* se presentó en los dos casos abundante células productoras de IL-17 A en la zona II (100%).

7. DISCUSIÓN

Los granos de micetomas están rodeados por 3 zonas de células inflamatorias. De acuerdo con Mahgoub y Murray la zona I, la cual es la zona más cercana al grano se compone principalmente de neutrófilos. La zona II, consiste principalmente de macrófagos y la zona más externa, la zona III contiene linfocitos y células plasmáticas (Hassan, Ahmed, Ismail, & Veress, 2001). Dado que la reacción inflamatoria que rodea los granos de micetoma difiere según la zona, la presencia de células productoras de IL-17A también lo hacen. Por lo que la presencia de estas células en los actinomicetomas por *N. brasiliensis* se observó mayormente en la zona II. Con respecto al actinomicetoma causado por *A. madurae* la IL-17A se observó en la zona II.

Actualmente, existe evidencia de la presencia de IL-17A en la reacción inflamatoria en infecciones por *M. mycetomatis*, *A. pelletieri* y *S. somaliensis* para los tres agentes causales, la mayor expresión se observó en la zona I (dentro del citoplasma de neutrófilos) y II (dentro del citoplasma de macrófagos), la menor expresión se observó en la zona III (dentro del citoplasma de linfocitos) (Siddig EE, 2019). Una respuesta similar a la que se da en actinomicetomas por *N. brasiliensis* y *A. madurae*, ya que observamos la mayor cantidad de células productoras de IL-17A en la zona II, mucho menor o muy poca en las zonas I y III.

En el presente estudio se observó que el 100% de los casos de micetomas por *A. madurae* presentan abundante células productoras de IL-17A en la zona II. En el caso de *N. brasiliensis* sólo se observó en el 29% en la zona II de los casos estudiados.

En el estudio que realizó Edward Siddig y colaboradores, observaron una relación con la cantidad presente de IL-17A y la extensión y duración de la lesión, presentándose mayor cantidad de IL-17A en lesiones más grandes y de mayor duración. Esto podría explicar por qué se observa mayor cantidad de IL-17A en los actinomicetomas por *A. madurae* que en los actinomicetomas por *N. brasiliensis*.

Uno de los inconvenientes de nuestro estudio es que no se tiene conocimiento de la cronicidad del actinomicetoma en los pacientes, por lo que no podemos relacionar la diferencia de la poca y abundante presencia de IL-17A en los diferentes pacientes de actinomicetomas por *N. brasiliensis*. Sin embargo, se sabe que a partir del día 30 de infección por *N. brasiliensis* la IL-17A comienza a decaer hasta alcanzar niveles muy bajos, a pesar de que la enfermedad es persistente (Liñan, 2010). Lo anterior podría explicarse a un estado de cronicidad de la enfermedad, donde la bacteria se encuentra en forma latente dentro de las células fagocíticas, rodeadas por fibras de colágena y linfocitos formando el granuloma y a falta de estímulo, no se agregan más subpoblaciones de linfocitos, en este caso de los productores de IL-17A (Solis Soto, et al., 2008).

8. CONCLUSIÓN

Se encontró la presencia de células productoras de IL-17A en los actinomicetomas, las cuales se observaron en mayor cantidad en la zona II que rodea al grano. El micetoma por *A. madurae* presentó mayor cantidad de células productoras de IL-17A a diferencia de los actinomicetomas por *N. brasiliensis*.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Murphy, K., & Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, *383*, 787-793.
- Ahmed AOA, Van de Sande, Fahal A, Bakker- Woudenberg, I., & Verbrugh H. (2007). Management of mycetoma: major challenge in tropical mycoses with limited international recognition. *Curr Opin Infect Dis*, *20*(2), 146-151.
- Arenas Guzmán, R. (2014). *Micología Médica Ilustrada* (5 ed.). México, Ciudad de México: Mc Graw Hill.
- Barroeta S, L. P. (1987). *Memorias del II Simposio Internacional de Micetomas*. Taxco Guerrero, México: Grupo Internacional de Investigación en Actinomicetos Patógenos (GIIAP).
- Boiron, P., R. Locci, M., Goodfellow, M., Gumaa, S. A., Isik, K., Kim, B., . . . Shojaei, H. (1998). Nocardia, nocardiosis and mycetoma. *Med Mycol*, *1*, 26-37.
- Fahal, A. (2004). Mycetoma thorn on the flesh. *Trop Med Hyg*, *98*(1), 3-11.
- Fahal, A., & Suliman, S. (1994). Clinical presentation of mycetoma. *Sudan Med*, *32*, 46-66.
- Guimaraes, Castro, & Sotto. (2003). Lymphocyte subsets, macrophages and Langerhans cells in actinomycetoma and eumycetoma tissue reaction. *Acta Trop*, *87*(3), 377-84.
- Hassan MA, & Fahal AH. (2004). Mycetoma: in Tropical Surgery; Kamil R, Lumbly J. *Westminster Publication Ltd*, 30-45.
- Hassan, A., Ahmed, A., Ismail, A., & Veress, B. (2001). The immunopathology of actinomycetoma lesions caused by *Streptomyces somaliensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, *95*(1), 89-92.
- Hernandez, A. S. (2009). Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatología Clínica*, *5*(S1), 1-5.
- Infante Duarte, C., F. Horton, H., Byrne, M. C., & Kamradt, T. (2000). Microbial Lipopeptides Induce the Production of IL-17 in Th Cells. *The Journal of Immunology*, *165*(11), 6107-6115.
- Kindt, T. J., G., R. A., & Osborne, B. A. (2007). *Inmunología de Kuby*. México: McGraw Hill.
- Kolls, J. (2004). Interleukin-17 Family Members and Inflammation. *Immunity*, *21*(4), 467-76.

- Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V., & Bettelli, E. (2007). Th17 cells: Effector T cells with inflammatory properties. *National Institute of Health*, 19(6), 362-71.
- Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2001). Antigen decoding by T lymphocytes: From synapses to fate determination. *Nat Immunol*, 2, 487-492.
- Liñan, A. P. (2010). *Dinámica de subpoblaciones de linfocitos T reguladores, TH17 y TC17 en el actinomicetoma experimental inducido por Nocardia brasiliensis en ratones BALB/c*. Jalisco: Universidad de Guadalajara.
- Lopez Barcenas, P., Arenas Guzman, R., Palma Ramos, A., & Castrillon Rivera, L. E. (2008). Identificación de células y mediadores inflamatorios en lesiones de pacientes con diagnostico de micetoma. *Dermatología Rev Mex*, 52(6), 247-53.
- López Martínez, R., Méndez Tovar, L. J., Bonifaz, A., Arenas, R., Mayorga, J., Oliverio, W., . . . et.al. (2013). Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos. *Gaceta Médica de México*, 149, 586–592.
- Lopez Martinez, R., Mendez Tovar, L., La Valle P, Welsh O, & Saul A. (1992). Epidemiología del micetoma en México: estudio de 2,105 casos. *Gac Med Mex*, 128, 477-81.
- Mahgoub ES, & Murray LG. (1973). Mycetoma. *Heinemann Medical Books*.
- Massafera Tristao , F., Agostini Rocha, F., Ketelut Carneiro, N., Silva Souza, C., Milanezi, C., & Santana Silva, J. (2017). Th17-Inducing Cytokines IL-6 and IL-23 Are Crucial for Granuloma Formation during Experimental Paracoccidioidomycosis. *Front. Immunol.*, 21(8), 949. doi:10.3389/fimmu.2017.00949
- Moissec, P., & Kolls, J. K. (2012). Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nature Reviews*, 11(10), 763-76.
- Mosmann, T., & Coffman, R. (1989). TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 7, 145-173.
- Omer, R., FA, A., & AH, F. (2016). Hand Mycetoma: The Mycetoma Research Centre Experience and Literature Review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(8), 1-13.
- Padilla Desgarenes, C., & Guardado Díaz, V. (2009). Micetoma por Actinomadura madurae en un paciente con tuberculosis pulmonar. Comunicación de un caso. *Dermatología Rev Mex*, 53(3), 145-9.
- Padilla, M. d., Novales, J., & Juárez, V. (2004). Minimicetoma. Presentación de un caso. *Rev Cent Dermatol Pascua*, 13(1), 41- 44.
- Palma Ramos, A., Castrillón Rivera, L., Padilla Desgarenes, C., & Reyes Fuentes, F. (2005). Caracterización histoquímica de micetomas por Actinomadura madurae, Nocardia brasiliensis y Madurella mycetom. *Dermatología Rev Mex*, 49, 51-58.
- Rosas Taraco, A., Perez Liñan, A., Bocanegra Ibarias, P., Perez Rivera, L., & Salinas Carmona, M. (2012). Nocardia brasiliensis induces an immunosuppressive microenvironment that favors chronic infection in BALB/c mice. *Infect Immun*, 80(7), 2493-9.

- Salinas Carmona, M. C., Torres Lopez, E., Ramos, A. I., Licon Trillo, A., & Gonzalez Spencer, D. (1999). Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect Immun*, *67*, 2428-2432.
- Salinas Carmona, M., & C., M. (2000). *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. *Microbes Infect*, *2*, 1373-1381.
- Serrano, J. A., H, S. A., & Beaman Blaine, L. (2007). *Actinomycetoma*. México: Plaza y Valdez.
- Serrano, J., & Sandoval, A. (2003). El micetoma. Revisión. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, *23*(1), 70-79.
- Siddig EE, M. E. (2019). Interleukin-17 and matrix metalloprotease-9 expression in the mycetoma granuloma. *PLOS Neglected Tropical Diseases* *13*(7), 3-11.
- Silva, A., Criado, P., Nunes, R., da Silva, W., Kanashiro-Galo, L., Duarte, M., & al., e. (2014). In Situ Immune Response in Human Chromoblastomycosis- A Possible Role for Regulatory and Th17 T Cells. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *8*(9).
- Solis Soto, J. M., Quitanilla Rodriguez, I., Meester, J. C., Segoviano Ramirez, J. L., Juárez, V., & Carmona, S. (2008). In situ detection and distribution of inflammatory cytokines during the course of infection with *Nocardia brasiliensis*. *Histol Histopathol*, *23*, 573-681.

**DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
LICENCIATURA QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL
Presencia de Interleucina – 17 A en Actinomicetomas

PERTENECE AL PROYECTO GENÉRICO
Evaluación de productos relacionados con la salud

ALUMNA: Gabriela Ortiz Delgadillo

Matricula: 2143074811

DIRECCIÓN: Calle Tizapan #305, Ampl. José Vicente Villada,
Nezahualcoyotl, Estado de México. Cel. 55-37-08-61-75

ASESORES: M. en C. Alejandro Palma Ramos
M en C. Felipe Mendoza Pérez

Fecha de inicio y terminación: 5 noviembre de 2018 – 5 de mayo 2019

10. RESUMEN

10.1 INTRODUCCIÓN

El micetoma es una enfermedad inflamatoria crónica, granulomatosa, subcutánea causada por hongos verdaderos (eumicetomas) o bacterias filamentosas (actinomicetomas) (Fahal AH, 2004). Es de gran importancia en México, tanto por su frecuencia como por la gravedad de algunos casos. Hasta el 2012, se han registrado 3,933 casos en los últimos 54 años; de los cuales el 96.52% corresponde a micetomas causados por bacterias filamentosas y el principal agente etiológico es *Nocardia brasiliensis* (65.58%) seguido de *Actinomadura madurae* (7.93%) (López Martínez, et al., 2013).

Se ha demostrado que en el actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* se encuentran altos niveles de INF- γ principal citocina relacionada con la respuesta TH1, que además está asociada con la activación de macrófagos y sus mecanismos microbicidas. Por otro lado, se encontraron altos niveles de IL-4, IL-6, e IL-10, las cuales se relacionaron con la respuesta de TH2 y la inducción de la respuesta de anticuerpos (Liñan, 2010). Sin embargo, se ha descubierto que no sólo la respuesta de TH1 y TH2 son las únicas implicadas en la respuesta inflamatoria de este padecimiento, sino que también TH17 está relacionada.

Las TH17 son el tercer tipo de células colaboradoras y desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra bacterias y hongos extracelulares, que no son eliminados de manera eficiente por las respuestas TH1 y TH2 (Korn, Oukka, Kuchroo, & Bettelli, 2007). Asimismo, se ha descrito para ellas un efecto proinflamatorio que les permite hacer de puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Además de ser secretoras de IL-17 (Hernandez, 2009).

La IL-17 es una citocina pro-inflamatoria que ha sido relacionada con procesos inflamatorios crónicos (o bien, que presentan una reacción de hipersensibilidad tardía) como infecciones bacterianas y micóticas (Liñan, 2010) (Moissec & Kolls, 2012). La IL-17A es la primera de una familia de citocinas (familia de la IL-17). Actualmente se conocen 6 moléculas diferentes que se nombran desde IL-17A a IL-17F (Hernandez, 2009). Sin embargo, sólo IL-17A e IL-17F son homólogos estructuralmente y las dos emplean el mismo receptor IL-17RA. Tanto IL-17A como IL-17F promueven a su vez, la secreción de G-CSF (Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos), otra importante citocina para la estimulación de neutrófilos y, por lo tanto, un factor importante dentro de un proceso inflamatorio (Korn, et al., 2007).

Actualmente existe evidencia de la presencia de IL-17A en la inflamación en actinomicetomas causados por *N. brasiliensis* (Liñan, 2010). Sin embargo, estos estudios se han llevado a cabo en ratones. Por otro lado, no se tiene evidencia de la implicación de la IL-17A en actinomicetomas por *Actinomadura madurae*. Por lo que en este trabajo se estudió la presencia de IL-17A en actinomicetomas causados por

N. brasiliensis y *A. madurae* en biopsias de pacientes con diagnóstico de micetoma, utilizando una técnica de hibridación *In situ*.

10.2 OBJETIVOS

Demostrar la presencia de la IL-17 A por hibridación *in situ* en pacientes con diagnóstico de micetoma por *Nocardia brasiliensis* o *Actinomadura madurae*.

10.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Demostrar la presencia de la IL-17A en pacientes con diagnóstico de micetoma por *Nocardia brasiliensis*.

Demostrar la presencia de IL-17A en pacientes con diagnóstico de micetoma por *Actinomadura madurae*.

Comparar la presencia de IL-17A en pacientes con *N. brasiliensis*, o *A. madurae*.

10.3 CONCLUSIÓN

Se encontró la presencia de células productoras de IL-17A en los actinomicetomas, las cuales se observaron en mayor cantidad en la zona II que rodea al grano. El micetoma por *A. madurae* presentó mayor cantidad de células productoras de IL-17A a diferencia de los actinomicetomas por *N. brasiliensis*.

10.4 BIBLIOGRAFÍA

Fahal, A. (2004). Mycetoma thorn on the flesh. *Trop Med Hyg*, 98(1), 3-11.

Hernandez, A. S. (2009). Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatología Clínica*, 5(S1), 1–5.

Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V., & Bettelli, E. (2007). Th17 cells: Effector T cells with inflammatory properties. *National Institute of Health*, 19(6), 362-71.

Liñan, A. P. (2010). *Dinámica de subpoblaciones de linfocitos T reguladores, TH17 y TC17 en el actinomicetoma experimental inducido por Nocardia brasiliensis en ratones BALB/c*. Jalisco: Universidad de Guadalajara.

López Martínez, R., Méndez Tovar, L. J., Bonifaz, A., Arenas, R., Mayorga, J., Oliverio, W., . . . et.al. (2013). Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos. *Gaceta Médica de México*, 149, 586–592.

Moissec, P., & Kolls, J. K. (2012). Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nature Reviews*, 11(10), 763-76.