

Avances en:

## STATUS INMUNOLOGICO DEL PACIENTE CON MICETOMA\*

Dra. Marina Calcagno\*\*

## RESUMEN

Los resultados de las observaciones clínicas y las investigaciones inmunológicas de pacientes con micetomas sugieren que puede haber una alteración en algunas de las funciones de la inmunidad mediada por células. Los mecanismos de resistencia del hospedador a las infecciones por *Nocardia* han sido asociadas con: 1) la inhibición de las Nocardias por parte de los monocitos y leucocitos polimorfonucleares, 2) la activación de los macrófagos y 3) la citotoxicidad específica de una población de células T. La inmunidad humoral no parece brindar protección contra las infecciones producidas por la *Nocardia*. Sin embargo, hay producción de anticuerpos los cuales podrían ser valiosos en el serodiagnóstico del micetoma.

## SUMMARY

Clinical observations and immunological investigations on patients with mycetoma suggest that there may be an underlying alteration in some cell mediated immunity functions. The mechanisms of host resistance against infections with *Nocardia* have been associated to: 1) the inhibition of *Nocardia* by monocytes and polymorphonuclear leukocytes, 2) the activation of macrophages and 3) the specific cytotoxicity of a population of T cells. The humoral immunity does not seem to protect the host from infections produced by *Nocardia*. However, there are antibodies production that may be of serodiagnostic value.

PALABRAS CLAVES: Micetoma - Inmunología.

### STATUS INMUNOLOGICO DEL PACIENTE CON MICETOMA

El micetoma es una enfermedad crónica de la piel y tejido celular subcutáneo, encontrada en el hombre y otros animales. Está caracterizada por tumoraciones inflamatorias indoloras, con trayectos de drenaje o presencia de fístulas por las que drenan "granos" que son microcolonias del organismo causal. Recientemente Lavallo (1) clasifica los procesos fistulosos de acuerdo a la presencia y tipo de grano, tipo de organismo causal y modo de inoculación. En esta clasificación los procesos fistulosos los agrupa en tres clases: los Micetomas, los Paramicetomas y los Pseudomicetomas.

La enfermedad tiene una etiología múltiple y la misma es producida por un gran número de bacterias del orden Actinomycetales y hongos Eumicetos. Los micetomas producidos por actinomicetales se les denomina actinomicetomas para diferenciarlos de los eumicetomas o micomicetomas

producidos por hongos. Los actinomicetales más frecuentemente implicados son: *Nocardia brasiliensis*, *N. asteroides*, *N. otitidis caviarum*, *Actinomyces madurae*, *A. pelletieri*, *Streptomyces somaliensis* y *Nocardia janselmii*. Los eumicetomas tienen etiología aún más variada, encontrándose *Madurella grisea*, *M. micetomatis*, *Pyrenochaeta romeroi*, *Acremonium falciforme*, *Exophiala janselmii*, *Curvularia geniculata*, *Soedospodium apiospermum*, *Leptosheria senegalensis* y otros más. A pesar de la gran diversidad de los agentes causales todos ellos comparten dos características en común, el tener un habitat exógeno y producir granos filamentosos que drenan de las lesiones (2).

Los micetomas se adquieren por la inoculación traumática de la dermis o tejido subcutáneo con los organismos saprófitos que habitan el suelo. No son contagiosos de persona a persona, se presentan en ambos sexos, pero con más frecuencia en hombres que

en mujeres. En nuestro país la mayoría de los pacientes se encuentran entre los 30 y 59 años de edad (3).

A pesar de su relativa alta endemicidad en regiones tropicales y subtropicales, un interrogante siempre está presente: ¿por qué sólo unos pocos pacientes desarrollan micetoma? En áreas endémicas la población está igualmente expuesta a pequeños traumas y al organismo causal, ello indica que otros factores además de la "primera infección" juegan un papel importante en la frecuencia de la enfermedad.

Los estudios clínicos inmunológicos de pacientes con micetoma reflejan una alteración en algunas funciones de la respuesta inmunológica del hospedador frente a la infección por los organismos causales. Mahgoub y colaboradores (4) han reportado observaciones interesantes de pacientes atendidos en una clínica especializada en micetomas en Khartoum (Norte

\* Trabajo presentado en las XVI Jornadas Nacionales de Microbiología. Nov. 1987, Mérida.

\*\* Investigadora Residente de CONICIT. Unidad de Ultraestructura. Instituto de Anatomía Patológica. Hospital Universitario de los Andes. Mérida. Teléfono: (074) 638409.

de Sudán). En esta clínica en un período de siete años han tratado a 350 pacientes con micetoma. Ellos reportan casos de pacientes con reinfección en sitios diferentes a la lesión original y con agentes etiológicos diferentes, un paciente con infección causada por *Madurella micetomatis* en un pie y con *Actinomadura pelletieri* en la rodilla del otro miembro, pacientes con lepra infectados además con *Myco.jacterium micetomi*, padre e hijo infectados con *Madurella micetomatis*, madre e hija infectadas con *Streptomyces somaliensis* e historias de cuatro pacientes que tenían parientes cercanos con micetoma. Estas observaciones sugieren una posible deficiencia o alteración de la respuesta inmunológica de los pacientes con micetoma.

A varios pacientes con micetomas se les evaluó la respuesta mediada por células mediante las pruebas de la tuberculina, sensibilización con dinitroclorobenceno (DNCB), la proliferación de linfocitos inducidos con fitohemaglutinina y los niveles de inmunoglobulinas. Los investigadores sugieren que los resultados de estas pruebas muestran evidencias de una deficiencia en la inmunidad mediada por células en los pacientes con micetomas. Sin embargo, aun cuando los valores obtenidos en las pruebas sean significativos, no por ello son conclusivos de una inmunodeficiencia. Los resultados en tal caso reflejan, una posible alteración de algunas de las funciones de la respuesta inmune determinadas a través de estas pruebas.

El estudio de los diferentes aspectos inmunológicos del micetoma están confinados a unos pocos agentes causales. Se han desarrollado varios modelos los experimentales en animales de laboratorio con el objeto de analizar la respuesta del hospedador frente a la infección así como de estudiar las bases bioquímicas y estructurales de la patogenicidad. Casi todas las investigaciones se han realizado en unos pocos miembros del género *Nocardia* (5, 6, 7). Muy poca información se tiene sobre los géneros *Actinomadura*, *Streptomyces* y sobre las infecciones producidas por hongos *Eumicetos*. Por lo tanto, en esta revisión nos limitaremos a presentar los mecanismos de resistencia del hospedador y la patogenicidad de las *Nocardias* que producen actinomicetomas.

### INMUNIDAD NO ESPECIFICA: INTERACCION FAGOCITO NOCARDIA

Los macrófagos y los leucocitos polimorfonuclear eliminan la mayoría de los Actinomycetales del tejido del hospedador mediante la fagocitosis. Una vez que un agente infeccioso, tal como la *Nocardia* es fagocitado, puede ser destruido, o persistir dentro de la célula en una forma alterada y posiblemente replicarse. Las células de *Nocardia* pueden crecer como parásito intracelular facultativo en el macrófago no siendo así en el leucocito polimorfonuclear (5).

Filice y colaboradores (8) encuentran que los neutrófilos y los monocitos humanos fagocitan e inhiben el crecimiento *in vitro* de las cepas de *Nocardias*, pero no las destruyen. Las *Nocardias* virulentas no son inhibidas y son resistentes a la destrucción por los neutrófilos a pesar de la producción de metabolitos tóxicos por el fagocito. Esta resistencia pareciera ser parcialmente debida a la producción por parte del microorganismo de altos niveles de catalasa.

El papel del macrófago en la defensa del hospedador contra infecciones por *Nocardia* se ha determinado utilizando macrófagos provenientes del pulmón de conejos infectados y no infectados con *Nocardia asteroides* (9). Las células de *Nocardia* son capaces de sobrevivir y crecer dentro de los macrófagos alveolares de animales no infectados. Sin embargo, los macrófagos de animales infectados inhiben el crecimiento de las *Nocardias*, la inhibición es más efectiva cuando las cepas se encuentran en fase estacionaria de crecimiento comparada con las cepas en fase logarítmica. Aún más, los macrófagos activados inhiben más efectivamente el crecimiento de las *Nocardias* cuando se preincuban con linfocitos específicamente activados, provenientes de ganglios linfáticos, combinados con sueros de animales infectados con actividad de complemento y surfactantes de pulmón. Estos resultados indican que el estado activado del macrófago es un componente esencial en la determinación de la defensa del hospedador en las infecciones producidas por *Nocardia*.

En el laboratorio del Dr. Beaman se ha encontrado que los macrófagos

aislados de diferentes sitios anatómicos de ratones BALB/c muestran actividades fagocitarias y bactericidas diferentes frente a la *Nocardia*. Estos resultados se han demostrado tanto en ensayos *in vivo* (10), como *in vitro* (11).

Black y col. (11) comparan la actividad fagocitaria y bactericida de macrófagos alveolares, peritoneales, de hígado y pulmón provenientes de ratones BALB/c normales e infectados con cepas virulentas y poco virulentas de *Nocardia asteroides*. La cepa *N. asteroides* GUH-2 es altamente virulenta, fue aislada por el Dr. Beaman del riñón de un paciente fallecido por nocardiasis diseminada en el Hospital de la Universidad de Georgetown, Washington D.C., U.S.A. La cepa *N. asteroides* ATCC- 10905 es poco virulenta y proviene de la Colección del American Type Culture Collection.

Los resultados muestran que los macrófagos de ratones infectados con *Nocardia* son más eficientes en destruir tanto las cepas virulentas como las poco virulentas de *Nocardia asteroides* que los ratones no infectados. Hay diferencias en la capacidad fagocitaria y bactericida entre las diferentes poblaciones de macrófagos. En animales no infectados, los macrófagos del bazo son más eficientes en eliminar los organismos que los macrófagos del hígado o del pulmón. En animales infectados el orden de capacidad bactericida de los macrófagos es también diferente y depende no sólo del origen del macrófago sino también del tipo específico de la cepa de *Nocardia*. Cuando se infectan los ratones con la cepa virulenta de *Nocardia asteroides* GUH-2 los macrófagos del hígado muestran el mayor índice de fagocitosis y muerte de las *Nocardias* comparada con los macrófagos peritoneales, del bazo y pulmón. Cuando la infección se realiza con la cepa poco virulenta de *Nocardia asteroides* 10905, el orden de efectividad de la fagocitosis y muerte es macrófagos peritoneales, seguidos por macrófagos del bazo, alveolares y células del hígado. Se encontró también una correlación entre la eficiencia funcional de las diferentes clases de macrófagos frente a la *Nocardia* y la actividad enzimática (te la fosfatasa ácida lisosomal. La actividad enzimática de esta enzima estaba aumentada

en los macrófagos que más destruían a las *Nocardias* fagocitadas.

Se han descrito una serie de mecanismos y funciones de las cepas de *Nocardia virulenta* que pudieran contribuir a explicar la evasión, resistencia o neutralización de la acción bactericida de los macrófagos y neutrófilos, tales como: 1) la producción de altos niveles de catalasa y superóxido dismutasa las cuales reducen los productos de oxígeno tóxico generados por el fagocito, 2) la disminución de la actividad enzimática de las enzimas lisosomales de algunas poblaciones de macrófagos, 3) bloqueo de la acidificación del fagosoma, 4) inhibición de la fusión lisosoma-fagosoma (12, 13). Por otra parte, se han descrito una gran variedad de componentes de la pared celular de los Actinomycetales que están implicados en la patogenicidad y virulencia de estos organismos. Uno de estos componentes tales como el "factor cuerda (13-6 dimicolato de trealosa) se ha puesto en evidencia en *Mycobacterium* y *Nocardia* y demostrado que tiene efecto tóxico e induce la formación de granulomas en ratones (14).

Estos estudios indican que el estado activado del macrófago es un componente esencial, pero no una barrera suficiente para proteger al hospedador frente a las infecciones producidas por *Nocardia*.

## INMUNIDAD MEDIADA POR CELULAS

Se ha demostrado que fundamentalmente se induce la inmunidad mediada por células durante las infecciones producidas por *Nocardia*. Esta inmunidad se pone en evidencia *in vivo* por la reacción de hipersensibilidad retardada y por reacciones protectoras como son la formación de granuloma. Varios investigadores han ensayado la reacción de hipersensibilidad retardada en el hombre y en varios animales de laboratorio infectados con cepas de *Nocardia* (15, 16). Se han aislado y purificado antígenos somáticos y metabólicos de diferentes especies de *Nocardia* con el objeto de confirmar infecciones en animales de experimentación (15). La limitación de esta técnica ha sido el aislamiento y purificación de antígenos específicos.

El papel del linfocito T fue demostrado en experimentos de infección en ratones normales y congénitamente inmunodeficientes (atímicos o carentes de bazo) con cepas de *Nocardia otitidis-caviarium* y *Nocardia brasiliensis* (17, 18, 19, 20). En estos experimentos se utilizaron varias cepas de ratones y la inoculación se realizó a través de diferentes vías. Los resultados claramente demuestran que los animales deficientes en linfocitos T eran significativamente más susceptibles a las *Nocardias* que los ratones normales. La transferencia de linfocitos T provenientes de animales heterozygotos preinmunizados protegían a los ratones atímicos de la infección y muerte producida por las *Nocardias*. Los ratones atímicos y carentes de bazo no desarrollaban lesiones micetomatosas después de la infección; sino una enfermedad sistémica aguda con producción de abscesos purulentos que resultaba en la muerte de los animales.

Recientemente se ha encontrado que una población de linfocitos T se asocia a las *Nocardias* mediante el contacto membrana-pared y las destruye directamente en ausencia de otras células tales como leucocitos PMN, monocitos o macrófagos (21). La habilidad de estos linfocitos T de matar a las células de *Nocardia* es inmunológicamente específica y pudiera ser un mecanismo de defensa importante del hospedador ya que el patógeno es capaz de crecer y así evadir su destrucción por las células fagocíticas.

## INMUNIDAD HUMORAL

Aparentemente hay producción de anticuerpos circulantes durante las diferentes etapas del micetoma, sin embargo estos anticuerpos no parecen brindar una respuesta protectora frente a la infección (16, 22, 23). Por tal razón varios investigadores han utilizado diferentes técnicas inmunológicas con el objeto de desarrollar pruebas serológicas de rutina para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con micetomas. Se han detectado anticuerpos en pacientes infectados con diferentes especies de *Nocardia*, *Actinomadura*, *Streptomyces* y también *Eumicetos* mediante las pruebas de: Fijación de Complemento (24), la Doble difusión de Ouchterlony (25), Contrainmuno-electroforesis (26) y ELISA (ensayo

inmunoenzimático) (27). Los resultados indican que hay poca especificidad o un alto grado de reacción cruzada entre los antígenos provenientes de los diferentes géneros de Actinomycetales y Eumicetos. La mayor limitación de estas pruebas ha sido la producción de buenos antígenos para uso en el serodiagnóstico de rutina para todas y cada una de las especies productoras de micetoma.

Recientemente, Sugar y col. (28) han aislado e identificado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y la técnica de "Western blot" (Inmuno-electrotransferencia) dos antígenos proteicos provenientes de filtrados de cultivo de *N. asteroides*. Estos antígenos fueron utilizados para el serodiagnóstico de nocardiasis encontrándolo muy específico y no presentado reactividad cruzada con sueros de pacientes normales o con tuberculosis.

También, recientemente Beaman y col. (29) han producido una colección de diez anticuerpos monoclonales específicos para la cepa virulenta de *Nocardia asteroides* GUH 2. Todos ellos parecen tener alta especificidad en los ensayos de ELISA y las pruebas de aglutinación. Los anticuerpos monoclonales podrían representar una herramienta útil en la terapia (como la bala mágica), inmunoprofilaxis, inmunodiagnóstico y determinación de factores virulentos de *Nocardia*.

## CONCLUSIONES

La baja frecuencia del micetoma en áreas endémicas, la reinfección en sitios anatómicos diferentes a las lesiones originales así como la infección con varios agentes etiológicos reflejan en gran parte la respuesta inmunológica del paciente frente a la infección micetomatosa. Los estudios inmunológicos de pacientes con micetomas han sido escasos. Las determinaciones de la inmunidad celular se han realizado mediante pruebas indirectas de hipersensibilidad retardada como son la prueba de la tuberculina, la sensibilización con DNCB. Sin embargo, estos estudios sugieren que los pacientes con micetoma muestran una alteración en algunas de las funciones de la inmunidad mediada por células. Las *Nocardias* patógenas son eliminadas del tejido del hospedador mediante procesos no específicos tales como la fago-

citosis y por mecanismos específicos **dependientes de** la inmunidad mediada por células.

La resistencia a las infecciones por las Nocardias ha sido asociada con la activación de macrófagos, la inhibición del crecimiento de las Nocardias por los neutrófilos y por mecanismos específicos mediados por células T citotóxicas. Varios factores influyen en el destino de las Nocardias ingeridas. Estos incluyen el estado metabólico del fagocito, el tipo de fagocito, la disponibilidad, concentración y tipo de enzimas lisosomales dentro de los macrófagos o leucocitos polimorfonucleares y el tipo de cepa de *Nocardia*. Una deficiencia en uno de estos factores pudiera por lo tanto comprometer al hospedador y aumentar su susceptibilidad a adquirir las enfermedades producidas por las Nocardias.

La inmunidad humoral no parece brindar protección frente a las infecciones producidas por Nocardias. Hasta el momento no hay procedimientos serológicos establecidos para el diagnóstico y pronóstico del micetoma debido a la carencia de antígenos específicos purificados para las diferentes especies que producen micetomas. Es posible que la producción de anticuerpos monoclonales facilite no solamente el diagnóstico sino la orientación del tratamiento y la prevención de la enfermedad.

## BIBLIOGRAFIA

1. Lavalle, P.A. Micetomas: concepto, nomenclatura, clasificación y diferenciación. Resúmenes, II Simp. Int. de Micetomas, Taxco, Gro. México. 1987.
2. Restrepo, A.M. Enfermedades por Hongos. En Fundamentos de Medicina. Enfermedades infecciosas, págs. 191-195. Editado por: Velez, H.A., Borrero, J.R., Restrepo, J.M. y Rojas, W.M., tercera edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Colombia. 1984.
3. Serrano, J.A., Beaman, B., Mejía, M.A., Vitoria, J.E. and Zamora R. The Actinomycetoma in Venezuela: A ten year study (1976-1986). Resúmenes. II Simp. Int. de Micetomas, Taxco, Gro. México. 1987.
4. Mahgoub, E.S., Gumaa, S.A. and El Hassan, A.M. Immunological Status of mycetoma patients. Bulletin de la Société Pathologie Exotique 70: 48-54. 1977.
5. Beaman, B.L. Possible mechanisms of nocardial pathogenesis. En: Biology of the Nocardiae, págs. 386-417. Editado por: Brownell, G., Goodfellow, M. and Serrano, J.A., Academic Press, London. 1976.
6. Beaman, B.L. Mechanisms of pathogenesis and host resistance to the Actinomycetes. En: Actinomycetes, págs. 209-220. Zbl. Bakt. Mikro. Hyg. Suppl. 11. Editado por: K.P. Schaal and G. Pulverer. Fischer. Verlag. Stuttgart. New York. 1981.
7. Beaman, B.L. and Sugar, A.M. Nocardia in naturally acquired and experimental infections in animals. J. Hyg., Camb. 91: 393-419. 1983.
8. Fillice, G.A., Beaman, B.L., Krick, J.A., and Remington, J.S. Effects of human neutrophils and monocytes on Nocardia asteroides: failure of killing despite occurrence of the oxidative burst. J. of Infect. Dis. 142: 432-438. 1980.
9. Beaman, B.L. Interaction of Nocardia asteroides at different phases of growth with in vitro maintained macrophages obtained from the lungs of normal and immunized rabbits. Infect. and Immun. 26: 355-361. 1979.
10. Beaman, B.L., Gershwin, M.E., Ahmed, A., Scates, S.M. and Deem, R. Response of CBA/NxDBA2/F1 mice to Nocardia asteroides. Infect. and Immun. 35: 111-116. 1982.
11. Black, C.M., Beaman, B.L., Donovan, R.M. and Goldstein, E. Intracellular acid phosphatase content and ability of different macrophage populations to kill Nocardia asteroides. Infect. and Immun. 47: 375-383. 1985.
12. Beaman, B.L., and Black, C. Interaction of Nocardia asteroides in BALB/c mice: Modulation of macrophage function, enzyme activity and the induction of immunologically specific T-cell bactericidal activity. Current Topics in Microbiology 122: 138-147. 1985.
13. Beaman, B.L. Determinants of infection in Nocardiosis. En: Biological Biochemical and Biomedical aspects of Actinomycetes, págs. 635-645. Sixth Int. Symp. on Actinomycetes Biology. Editado por: Szabó, G., Biro, S. and Goodfellow, M. 1985.
14. Viscaya, L., Almeida, E., Ioneda, T., Diaz, I., Garcia, E. y Serrano, J.A. Estudios de los componentes lipídicos y de su actividad toxigénica de dos cepas de Nocardia asteroides. Resúmenes. II Simposio Int. de Micetomas. Taxco, Gro. México. 1987.
15. Ortiz-Ortiz, L. and Bojalil, L.F. Delayed skin reactions to cytoplasmic extracts of Nocardia organisms as a means of diagnosis and epidemiological study of Nocardia infection. Clin. Exp. Immun. 12: 225. 1972.
16. Ortiz-Ortiz, L., Contreras, M.F. and Bojalil, L.F. Delayed hypersensitivity to Nocardia antigens. En: Biology of Nocardiae, pag. 418. Editado por: Goodfellow, M., Brownell, G.H., Serrano, J.A. Academic Press. London. 1976.
17. Beaman, B.L., Gershwin, M.E. and Maslan, S. Infectious agents in immunodeficient murine models: Pathogenicity of Nocardia asteroides in congenitally athymic (nude) and hereditarily asplenic (Dh/+) mice. Infect. and Immun. 20: 381-387. 1978.
18. Beaman, B.L., Goldstein, E., Gershwin, M.E., Maslan, S., and Lippert, W. Lung response of congenitally athymic (nude), heterozygous, and Swiss Webster mice to aerogenic and intranasal infection by Nocardia asteroides. Infect. and Immun. 22: 867-877. 1978.
19. Deem, R.L., Beaman, B.L. and Gershwin, M.E. Adoptive transfer of immunity to Nocardia asteroides in nude mice. Infect. and Immun. 38: 914-920. 1982.
20. Folb, P.I., Timme, A. and Horowitz, A. Nocardia infections in congenitally athymic (nude) mice and other inbred mouse strains. Infect. and Immun. 18: 449-466. 1977.
21. Deem, R.L., Doughty, F.A. and Beaman, B. Immunologically specific direct T-lymphocyte mediated killing of Nocardia asteroides. J. of Immun. :130(5): 2401-2406. 1983.
22. Conde, C., Mancilla, R., Fresan, M., and Ortiz-Ortiz, L. Immunoglobulin and complement in tissues of mice infected with Nocardia brasiliensis. Infect. and Immun. 40: 1218-1222. 1983.
23. Rico, G., Ochoa, R., Oliva, A. and Ortiz-Ortiz, L. Role of antibody in Nocardia brasiliensis infection in mice. En: Actinomycetes, págs. 229-233. Zbl. Bakt. Mikro. Hyg. Suppl. 11. Editado por: K.P. Schaal and G. Pulverer. Fischer Verlag. Stuttgart. New York. 1981.

## AGRADECIMIENTOS

*Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. José Antonio Serrano por sus comentarios y discusión en la preparación de este manuscrito, así como también al Programa de Investigador Residente del CONICIT y al subsidio del CONICIT, Proyecto SI1263 los cuales han financiado este trabajo.*