

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



**EXPRESION DE GENES M1/M2 EN MACRÓFAGOS
PERITONEALES Y SU ASOCIACIÓN CON EL DESARROLLO DE
MICETOMA POR *Nocardia brasiliensis* EN RATONES BALB/c**

Por:

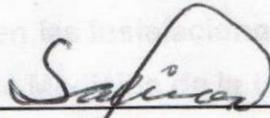
Tomás Alejandro Suárez Vázquez

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGIA MÉDICA**

JULIO 2022

**EXPRESION DE GENES M1/M2 EN MACRÓFAGOS
PERITONEALES Y SU ASOCIACIÓN CON EL DESARROLLO DE
MICETOMA POR *Nocardia brasiliensis* EN RATONES BALB/c**

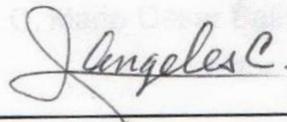
Aprobación de Tesis.



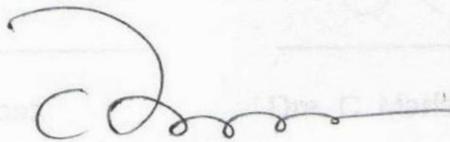
Dr. C. Mario César Salinas Carmona
Director



Dra. C. Nallely López López
Co-director



Dra. C. María de los Ángeles Castro Corona
Miembro de la comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

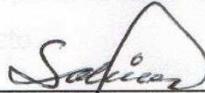
**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS AL
PERFIL M1/M2 EN MACROFAGOS PERITONEALES Y SU
RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE MICETOMA POR *Nocardia
brasiliensis* EN RATONES BALB/c**

Presentado por: Q.B.P. Tomás Alejandro Suárez Vázquez

Este trabajo fue realizado en las instalaciones del Departamento de
Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de
Nuevo León, bajo la dirección de Dr. C. Mario César Salinas Carmona y la co-
dirección de la Dra. C. Nallely López López.

Autorizado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina
y Hospital Universitario "José Eleuterio González" con número de registro:

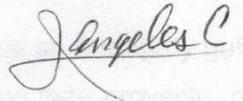
IN22-00001



Dr. C. Mario César Salinas Carmona
Director



Dra. C. Nallely López López
Co-director



Dra. C. María de los Ángeles Castro Corona
Miembro de la comisión

Agradecimientos

A Dios por darme la oportunidad de superarme día con día, quien sin su infinita misericordia y amor no estaría el día de hoy cumpliendo una más de mis metas.

A mis padres José Tomás Suárez Silva y Laura Alicia Vázquez Ontiveros quienes han sido mi motor, mi apoyo, mi ejemplo y mi fuerza. Gracias por darme las herramientas para salir adelante y poder superar una etapa más. Sin su amor y cariño no hubiera sido posible culminar con éxito.

A mi futura esposa Rhode Araceli Martínez Ascacio, por todo su amor, su cariño y apoyo. Gracias por creer en mí y por siempre ser mi centro y mi refugio. Eres y serás parte fundamental de mis éxitos y agradezco infinitamente a Dios por llegar a mi vida.

Al Dr. Mario Cesar Salinas Carmona por su guía, su apoyo y todas sus enseñanzas. Gracias Dr. Por creer en mí y darme la oportunidad de demostrar mi potencial, su dirección fue parte central de este proyecto.

A la Dra. Nallely López López por su paciencia, su entrega y su apoyo incondicional en este proyecto, gracias por motivarme y empujarme en cada uno de los retos presentados y sacar lo mejor de mí. Gracias por ayudarme a crecer humana y profesionalmente sin usted este proyecto no hubiera sido posible.

A la Dra. Maria de los Ángeles Castro Corona por toda su entrega y guía. Gracias por apoyarme en todas las vicisitudes que conllevaron este proyecto, gracias por siempre darme su apoyo en todo momento.

Al Dr. Manuel Guadalupe Mejía Torres por apoyarme en mis experimentos, por toda su paciencia y sus enseñanzas en el desarrollo de este trabajo. Gracias Dr. por su entrega y su amor a la ciencia.

Al Dr. Adrián Geovanni Rosas Taraco, por todas las facilidades brindadas para realizar los experimentos en su laboratorio, por su asesoría y su apoyo en el desarrollo de los experimentos de este proyecto.

A la química Azalea Martínez, por todo su apoyo brindado y su guía en los experimentos. Gracias por toda su paciencia y entrega.

A mis compañeros del departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la UANL. Dra Velia, Lucero, Edgar, Antonio, Pablo, Manuel, Paola, Isary, Kevin, Kenia, Diana, Raquel, Brenda, Gloria por siempre escucharme y darme ánimos en los momentos difíciles y por todo lo positivo que han traído a mi vida. Gracias por hacer de mi vida y mi trabajo un lugar más placentero.

INDICE

Contenido	Página
CAPITULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Micetoma	2
1.2 Agentes Causales	2
1.3 Distribución geográfica y epidemiología	2
1.4 <i>Nocardia brasiliensis</i>	4
1.5 Respuesta inmune innata contra <i>Nocardia brasiliensis</i>	6
1.6 Activación clásica de macrófagos (M1)	8
1.7 Activación alternativa de macrófagos (M2)	10
CAPITULO 2	12
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	12
CAPITULO 3	13
HIPOTESIS	13
CAPITULO 4	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECIFICOS	14
CAPITULO 5	15
MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1 Animales de experimentación	15
5.2 Cepa de <i>Nocardia brasiliensis</i>	15
5.3 Preparación del inóculo de <i>Nocardia brasiliensis</i>	15

5.4 Evaluación clínica del desarrollo del micetoma	16
5.5 Diseño experimental	16
5.6 Método de eutanasia	17
5.7 Obtención de macrófagos peritoneales	17
5.8 Prueba de fagocitosis	17
5.9 Estrategia de análisis para ensayo de fagocitosis por citometría de flujo	18
5.10 Evaluación de la expresión de <i>TNFA</i> y <i>CD206</i> en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c por RT-PCR	21
5.11 Análisis estadístico	25
5.12 Análisis e interpretación de la información	25
CAPITULO 6	26
RESULTADOS	26
6.1 Evaluación clínica del micetoma	26
6.2 Evaluación del porcentaje de fagocitosis de los macrófagos peritoneales obtenidos de ratones con actinomicetoma	27
6.3 Evaluación de la expresión de <i>TNFA</i> y <i>CD206</i> en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c por RT-PCR	31
CAPITULO 7	35
DISCUSIÓN	35
CAPITULO 8	41
CONCLUSIÓN	41
REFERENCIAS	42

LISTA DE TABLAS

Contenido	Página
TABLA 1. Filogenia de <i>Nocardia brasiliensis</i>	5
TABLA 2. Distribución de ratones por grupos de trabajo	16
TABLA 3. Volúmenes de reactivos para extracción de ARN	23
TABLA 4. Volúmenes de reactivos por reacción	24
TABLA 5. Secuencias de <i>primers</i> para la RT-qPCR	25

LISTA DE FIGURAS

Contenido	Página
FIGURA 1. Ocupación laboral en 3,123 casos en México.	3
FIGURA 2. Distribución geográfica de 3,933 casos de micetoma en México.	3
FIGURA 3. Lesión experimental de actinomicetoma.	4
FIGURA 4. Factores que modulan la polarización de macrófagos hacia el Fenotipo M1/M2.	8
FIGURA 5. Estrategia de análisis para la identificación de Macrófagos peritoneales en base a los parámetros de complejidad (SSC-A), tamaño (FSC-A) y expresión de F4/80.	20
FIGURA 6. Evolución clínica del actinomicetoma.	26
FIGURA 7. Miembro anterior izquierdo de un ratón BALB/c sin infección (panel A y B) y con Infección (panel C y D) por <i>Nocardia brasiliensis</i> (Micetoma).	27
FIGURA 8. Porcentajes de fagocitosis de macrófagos peritoneales (+) para F4/80.	28
FIGURA 9. Porcentaje de fagocitosis de macrófagos peritoneales en base al nivel de expresión del marcador F4/80.	30
FIGURA 10. Curva de amplificación de los genes RNA18s, <i>TNFA</i> y <i>CD206</i> en macrófagos de bazo provenientes de ratones infectados con <i>Nocardia brasiliensis</i> al día 45 posterior a infección	31

FIGURA 11. Curvas de amplificación de los genes *RNA18s*, *TNFA* y *CD206* en macrófagos de bazo estimulados *in vitro* con LPS (100 ug/mL) e IL-10 (25 ng/mL). A) Gen *RNA18s*. B) Gen *TNFA* y C) *CD206* 32

Figura 12. Curvas de amplificación de los genes asociados al perfil M1/M2 en macrófagos peritoneales provenientes de ratones infectados con *Nocardia brasiliensis* en los días 5, 15 y 45 posterior a infección. 33

LISTA DE ABREVIATURAS:

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADH3	Alcohol deshidrogenasa 3
ARG-1	Arginasa 1
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
CD	Clúster de diferenciación
cm³	Centímetros cúbicos
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGF	Epidermal Growth Factor
FSC-A	Forward scatter
GATA6	Factor de unión a GATA 6
g.	Gramos
HUJEG-1	Hospital Universitario José Eleuterio González
IFN-γ	Interferón gamma
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-18	Interleucina 18
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-23	Interleucina 23
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6

IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa Inducible
Lbs	Libras
LPM	Large Peritoneal Macrophages
LPS	Lipopolisacárido
M1	Macrófago Activación Clásica
M2	Macrófago Activación Alternativa
MCP-1	Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1
MCSF	Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y Granulocitos
mg.	Miligramo
MHC-II	Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo II
mL.	Mililitros
mm.	Milímetro
MRC1	Receptor de Manosa C Tipo 1
nM	Nanomolar
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintasa
PAMPS	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PBS	Buffer de Fosfatos
PE	Ficoeritrina
pH	Potencial de Hidrogeno
RALDH2	Retinaldehido Deshidrogenasa
ROS	Especies Reactivas de Oxigeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	Reacción en Cadena de Polimerasa en Tiempo Real Semicuantitativa

SPM	Small Peritoneal Macrophages
SSC-A	<i>Side Scatter</i>
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformador-Beta
TM7	Transmembrana 7
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
Xg	Fuerza Centrífuga

Q.B.P. Tomás Alejandro Suárez Vázquez Fecha de titulación: JULIO 2022

Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Medicina

Título del trabajo: Evaluación de la expresión de genes asociados al perfil M1/M2 en macrófagos peritoneales y su relación con el desarrollo de micetoma por *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c

Número de páginas: 48

Candidato al Grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunología Médica

Área de Estudio: Inmunología Médica

Resumen: El actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* es una enfermedad infecciosa que produce inflamación crónica deformante del tejido afectado. Los macrófagos son una de las principales células encargadas de la eliminación de este patógeno; existen dos fenotipos de activación de macrófagos; los clásicos o M1 y los alternativos o M2. Se ha descrito que en el actinomicetoma predomina un ambiente local de células M2, sin embargo, se desconoce si el patógeno es capaz de modular el estado de activación de los macrófagos más allá del sitio de la infección; por lo tanto, se evaluó el fenotipo M1 y M2 en macrófagos peritoneales.

Objetivo: Evaluar los niveles de expresión de genes asociados al perfil M1/M2 en macrófagos peritoneales obtenidos de ratones con actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*.

Material y Métodos: Se infectaron 15 ratones BALB/C con una suspensión de *Nocardia brasiliensis* en el cojinete plantar del miembro posterior izquierdo. Se evaluó la evolución clínica posterior a la infección (día 5, 15 y 45) a través de la medición de la inflamación del sitio de la lesión, así como la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales por citometría de flujo y la expresión de genes asociados al perfil de macrófagos M1/M2 por RT-qPCR.

Resultados y conclusión: En el grupo de ratones que desarrollaron actinomicetoma, se observó inflamación aguda que disminuyó al día 21, sin embargo, a partir del día 28 se incrementó la inflamación macroscópica que se mantuvo hasta el día 45; la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales no mostró diferencias significativas respecto al grupo control. Los macrófagos peritoneales provenientes de ratones con actinomicetoma no expresan genes *TNFA* y *CD206* asociados al fenotipo M1/M2 respectivamente.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Micetoma:

El micetoma es una enfermedad infecciosa granulomatosa crónica, que clínicamente se presenta como una inflamación de los tejidos blandos similar a un tumor con formación del tracto sinusal o fistula que drena el material purulento que contiene los gránulos del agente causal de la enfermedad. El micetoma suele ser el resultado de la inoculación traumática del tejido subcutáneo con microorganismos presentes en el suelo; se puede clasificar como eumicetoma o actinomicetoma dependiendo de si la infección es causada por hongos filamentosos o actinomicetos filamentosos aeróbicos, respectivamente (Fahal AH. 2004-2006), (Welsh O. et al., 2007).

La inflamación crónica deformante del tejido afectado, que generalmente son las extremidades inferiores; ha sido catalogada como una enfermedad tropical desatendida. El tratamiento actual es caro y requiere meses o años para completarse, la intervención quirúrgica, incluida la amputación, es frecuente. Teóricamente, las enfermedades infecciosas producidas por bacterias u hongos pueden prevenirse mediante vacunación; sin embargo, no existe una vacuna disponible para esta y otras infecciones.

La característica del tejido afectado en humanos y en ratones es la inflamación aguda y crónica caracterizada por un gran número de microabscesos, granulomas, con células espumosas, macrófagos, linfocitos y fibrosis alrededor de las micro colonias de las bacterias (Salinas-Carmona, 2000).

Se han propuesto tres aspectos necesarios para que esta infección se establezca: la cantidad del inóculo, el estado del sistema inmune del hospedero, y la adaptación hormonal. La ocupación del paciente también influye en la presentación de la enfermedad, pues es común en personas que trabajan en condiciones rudimentarias sin prendas de protección o zapatos en el campo o al aire libre (Bonifaz A. et al., 2014).

1.2 Agentes causales:

En México, los actinomicetos representan alrededor del 98% de los casos, encontrándose *Nocardia brasiliensis* en el 86% de las infecciones. (López Martínez et al., 1992). La distribución de las bacterias infectantes muestra una fuerte variación geográfica. *Actinomadura pelletieri* es más común en regiones con más precipitaciones. Por el contrario, *Nocardia brasiliensis* y *Streptomyces somaliensis* predominan en áreas secas y desérticas. (Develoux M, 1995). El eumicetoma es producido por una variedad de hongos, incluidos los géneros *Acremonium*, *Fusarium*, *Leptosphaeria* y *Madurella*.

1.3 Distribución geográfica y epidemiología:

El micetoma es considerado una enfermedad ocupacional que predomina en trabajadores rurales de entre 20 a 40 años que habitan en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Estas zonas se encuentran ubicadas entre latitudes 15°S y 30°N, siendo los países con el mayor índice que presentan esta enfermedad India, Yemen y Pakistán, Sudán, Somalia, Mauritania, Senegal. (Welsh O, Vera-Cabrera, Salinas-Carmona, 2007). En el continente americano el micetoma tiene la mayor incidencia en Venezuela y México, pero se puede encontrar en casi cualquier país de Centro y Sudamérica (López Martínez et al., 1992).

En México hasta 2012, se han registrado 3,933 casos en los últimos 54 años. El 75.6% corresponde a hombres mientras que el 24.4% se da en mujeres. El 75.72% de los casos documentados se presentan en adultos de entre 16-50 años. El grupo laboral predominante son campesinos (58.41%), seguido de amas de casa (21.79%), ver figura 1. Los estados con mayor prevalencia son: Jalisco, Morelos, Nuevo León, Guerrero, Veracruz y Michoacán como se observa en la figura 2. El actinomicetoma tiene una frecuencia de 96.52% y el principal agente etiológico es *Nocardia brasiliensis* (65.58%).

Ocupación	n.º	%
Campesinos	1,823	58.41
Amas de casa	680	21.79
Obreros	179	5.74
Estudiantes	127	4.06
Albañiles	99	3.13
Empleados	63	2.02
Comerciantes	48	1.53
Trabajadores de limpieza	40	1.28
Choferes	26	0.83
Profesionistas	10	0.32
Otros	28	0.89
Total	3,123	100.00

Figura 1. Ocupación laboral en 3,123 casos en México. (López-Martínez *et al.*, 2013).

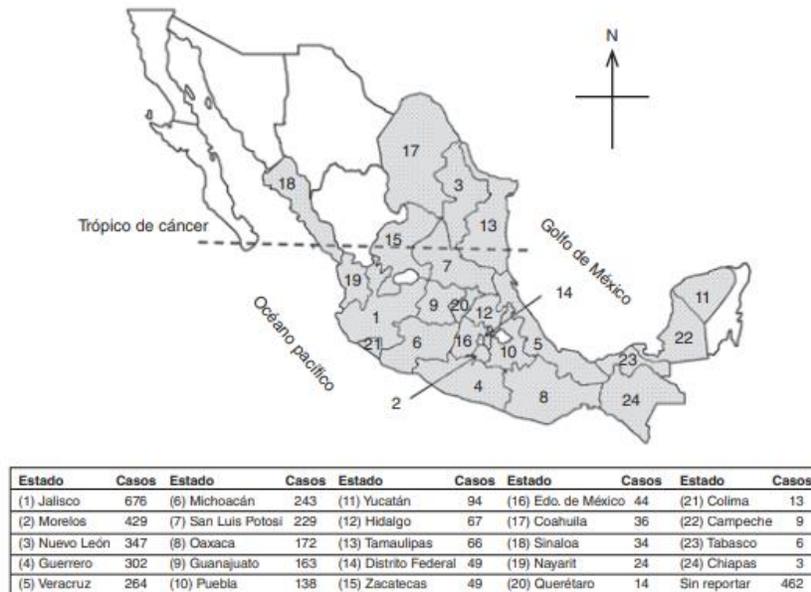


Figura 2. Distribución geográfica de 3,933 casos de micetoma en México. (López-Martínez *et al.*, 2013).

1.4 *Nocardia brasiliensis*:

Nocardia brasiliensis es una bacteria gram positiva inmóvil e intracelular la cual está clasificada como un actinomiceto aeróbico saprófito del suelo; ésta fue previamente considerada como un hongo debido a sus hifas aéreas, que se consideraron una característica fúngica, sin embargo, la presencia de peptidoglicano, lípidos de la pared celular y la ausencia de quitina ayudaron a definir su naturaleza bacteriana. Los libros de micología médica incluyen el micetoma producido por esta bacteria debido a sus similitudes clínicas con los micetomas producidos por especies de hongos. (Salinas-Carmona, 2000)

Los hallazgos histopatológicos en las lesiones de actinomicetoma humano producidos por *Nocardia brasiliensis* son idénticos a los inducidos en ratones experimentales; el aspecto macroscópico también es muy parecido. De tres a 5 días después de infectar a un ratón en la almohadilla de la pata trasera, se observa una hinchazón progresiva, hasta el día 14, luego se alcanza un estado estable aparente que dura aproximadamente una semana. Después de 1 mes de infección, los abscesos son visibles a través de la piel de la almohadilla del pie, algunos de ellos se abren y comienzan a descargar granos blancos como se muestra en la figura 3 (Salinas-Carmona, 2000).



Figura 3. Lesión experimental de actinomicetoma. Pata trasera de ratón infectado muestra múltiples abscesos después de 12 semanas de infección con *Nocardia brasiliensis*. (Salinas-Carmona, 2000)

El género *Nocardia* ha tenido una historia taxonómica conflictiva y confusa. En 1888, el veterinario Edmond Nocard aisló un organismo gram positivo que se pensaba era el agente causante de un caso de farcia bovina. Posteriormente fue Trevisan quien en 1989 nombro a esta cepa como *Nocardia farcinica* y desde ese momento fue como se le conoció a este género bacteriano como *Nocardia* (Goodfellow M-Maldonado LA. 2012).

Previo a las pruebas bioquímicas, *Nocardia brasiliensis* fue clasificada como un hongo por sus hifas aéreas. Sin embargo, la ausencia de quitina y la presencia de una pared celular con peptidoglicano y lípidos la clasifican indudablemente dentro del reino de las bacterias.

Una vez que se establece un punto de partida en la clasificación como la estructura de su pared celular agrupándola dentro de las bacterias Gram positivas, se asigna la clase a la cual pertenece que son las "Actinobacterias" las cuales abarcan desde el género *Arthrobacter*, el grupo *Myco / Coryne / Nocardia*, las *Atopobias* y los *Straptomycetos* (Garrity-Staley, 2005).Aunado a lo anterior las Actinobacterias presentan una sinapomorfia molecular única: una inserción homóloga de aproximadamente 100 nucleótidos entre las hélices 54 y 55 del gen 23S rARN. (Ventura, M. et al., 2007).

Dominio	<i>Eubacteria</i>
Reino	<i>Bacterias</i>
Filo	<i>Bacteria</i>
Clase	<i>Actinobacteriae:</i> Subclase: <i>Actinobacteridae</i>
Orden	<i>Actinomicetales</i> Suborden: <i>Corinebacterineae</i>
Familia	<i>Nocardiaceae</i>
Género	<i>Nocardia</i>
Especie	<i>Brasiliensis</i>

Tabla 1. Filogenia de *Nocardia brasiliensis*

Las características morfológicas y bioquímicas para identificar a este patógeno son las siguientes: su crecimiento en forma de hifas que pueden fragmentarse en

bastones de 0.5-1.2 μm , colonias onduladas y amarillentas que crecen en una semana en cultivo de agar infusión cerebro/corazón. En cultivo líquido llega a formar un bio-película flotante y suele estar en fase estacionaria al tercer día teniendo un ciclo de multiplicación de 6 horas. El bacilo es aerobio obligatorio, Gram positivo y ácido-alcohol resistente (en la tinción de Ziehl-Neelsen o en la adaptación de Kinyoun), ya que la capa exterior de micolatos inhibe la liberación del colorante. Al perder estos lípidos también se pierde la tinción (Bhatt A. et al., 2007). Las especies del género *Nocardia* son identificadas a través de pruebas microbiológicas, bioquímicas (como la capacidad de degradar caseína, tirosina, xantina o hipoxantina) y la susceptibilidad a antibióticos (McNeil, et al., 1974).

Los criterios quimiotaxonómicos para asignar bacterias al género *Nocardia* incluyen:

- a) Ácidos micólicos con cadena de carbonos de 46 a 60 (Butler W.R. et al., 1987).
- b) Ácido 2,6 diaminopimélico, arabinosa y galactosa (Lechevalier H.A., et al., 1970).
- c) Ácido tuberculosteárico y ácidos grasos insaturados (Lechevalier M.P et al., 1977).
- d) Presencia de menaquinona (Yamada Y., et al., 1977).

1.5 Respuesta inmune innata contra *Nocardia brasiliensis*:

El sistema inmune protege a todos los individuos de contraer infecciones por medio de la inmunidad innata y adaptativa. La inmunidad innata está conformada por mecanismos preexistentes que incluyen las barreras físicas y químicas (piel y mucosas, secreciones, enzimas, lagrimas), moléculas solubles y células como neutrófilos, células dendríticas, células linfoides innatas y de manera importante por los macrófagos (Anaya JM et al., 2013).

Los macrófagos son una de las principales células de la inmunidad innata ya que proporcionan una primera línea de defensa contra los patógenos mediante diversos mecanismos como fagocitosis, producción de citocinas y quimiocinas, especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, mantienen la homeostasis de tejidos y órganos y desempeñan un papel activo en la cicatrización de heridas, así como una

comunicación constante con la inmunidad adaptativa. La diversidad de funciones de este tipo de células depende en gran medida a una reprogramación molecular en respuesta a señales microbianas, ambientales y derivadas del sistema inmunitario que influyen en sus interacciones posteriores y se mantiene sin necesidad de un recambio celular gracias a la plasticidad de los macrófagos de polarizarse hacia un fenotipo u otro que difieren en términos de funciones efectoras, expresión de receptores en la superficie celular y producción de citocinas (Anaya JM et al., 2013).

En términos generales, se definen dos tipos principales de estados de activación o polarización en los mamíferos: un macrófago de tipo clásicamente activado (M1) asociado con el inicio y mantenimiento de la inflamación y un macrófago de tipo alternativamente activado (M2) asociados con la regeneración tisular o infección crónica.

Los macrófagos M1 se caracterizan por la producción de mediadores proinflamatorios como IL-12, IL-1 β , TNF α , IL-18 e IL-23, especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS) dependientes de óxido nítrico sintasa-2 (NOS-2/iNOS) así como una alta presentación de antígenos que da como resultado un fenotipo eficaz para eliminar patógenos, mientras que los macrófagos M2 producen citocinas inmunosupresoras como TGF- β e IL-10, enzimas como la arginasa-1 (ARG-1), receptor de manosa CD206, proteínas similares a la quitinasa y glicoproteínas que comparten homología con Ym1, que están relacionadas con la cicatrización de heridas y la síntesis de matriz extracelular. Sin embargo, los macrófagos M2 también pueden ser reservorios de patógenos intracelulares que facilitan la infección crónica debido a su actividad antiinflamatoria, lo cual propicia el crecimiento de tumores, así como inflamación alérgica (Atri C, Guerfali FZ, Laouini D., 2018).

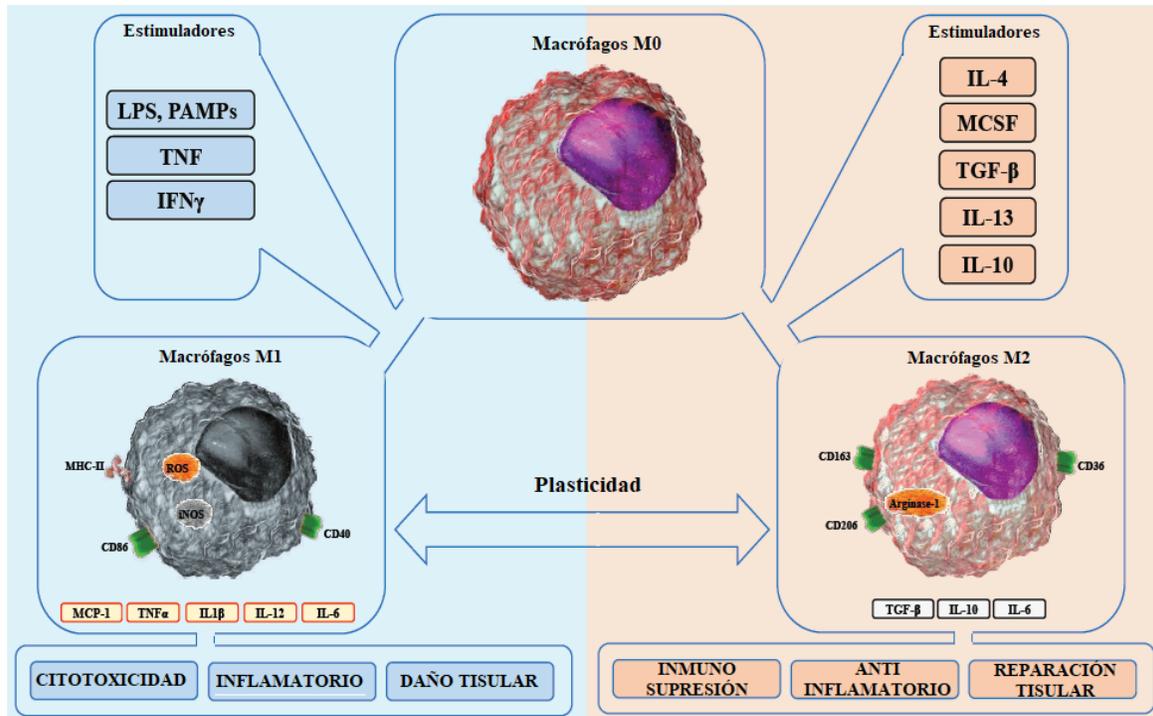


Figura 4. Factores que modulan la polarización de macrófagos hacia el fenotipo M1 o M2. Tomada de Ahmed I, Ismail N., 2020).

1.6 Activación clásica de macrófagos (M1)

1.6.1 Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α)

El TNF- α es una citocina pleiotrópica producida por tipos diferentes de células del cuerpo. Sin embargo, las células del linaje monocítico, como macrófagos, astroglia, microglía, células de Langerhans, células de Kupffer y macrófagos alveolares, son los principales sintetizadores de esta citocina (Parameswaran N, Patial S., 2010).

La subpoblación de macrófagos M1 produce este potente mediador que desempeña varias funciones biológicas, como diferenciación celular, proliferación y múltiples efectos proinflamatorios que regulan diversas funciones de estas células. Se libera rápidamente después de un traumatismo, infección o exposición a lipopolisacárido (LPS) de origen bacteriano y se ha demostrado que es uno de los mediadores tempranos más abundantes en el tejido inflamado. Por lo tanto, se considera que el TNF- α es un "regulador maestro" de la producción de citocinas proinflamatorias.

Además de las citocinas proinflamatorias, el TNF- α también aumenta los mediadores de la transducción de señales lipídicas, como las prostaglandinas y el factor activador de plaquetas (Parameswaran N, Patial S. 2010). Con base en estas funciones, se ha propuesto el TNF- α como un actor central en la activación y el reclutamiento de células inflamatorias y se sugiere que juega un papel crítico en el desarrollo de muchas enfermedades inflamatorias crónicas.

Los estudios sobre la señalización de TNF- α en macrófagos se han centrado principalmente en su activación aguda y transitoria. Sin embargo, en un estudio realizado por (Yarilina A., et al., 2008) analizaron las respuestas de los macrófagos primarios durante un período de 2 días después de la estimulación con TNF- α , los resultados de este estudio mostraron que TNF- α induce un bucle autocrino que se caracteriza por una producción baja y sostenida de IFN- β que actúa sinérgicamente con la señal canónica de TNF- α para inducir una expresión sostenida de genes que codifican moléculas inflamatorias que entrenan a los macrófagos para mejorar las respuestas al desafío posterior con productos microbianos o citocinas. Este ciclo de retroalimentación juega un papel importante en el mantenimiento de la inflamación.

1.6.2 Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS)

El óxido nítrico (NO) juega un papel importante en neurotransmisión, función vascular, defensa del huésped y regulación inmunitaria. Se sintetiza en células del sistema inmune innato y adaptativo como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células T respectivamente por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Yakovlev, V.A. et al., 2007), enzima independiente del calcio producida después de la inducción por citocinas u otros estímulos. La expresión de iNOS es utilizada como un marcador de diferenciación para macrófagos M1, ya que regula selectivamente genes relacionados al fenotipo proinflamatorio (Xue Q, Yan Y, Zhang R, Xiong H., 2018). El (NO) inactiva y destruye los agentes infecciosos desempañándose como agente citotóxico proinflamatorio para eliminar infecciones bacterianas o como regulador de la respuesta inmune adaptativa.

Los macrófagos infectados por bacterias expresan iNOS. Los estudios en humanos han identificado una mayor expresión de iNOS en macrófagos de pacientes infectados con tuberculosis en comparación con el grupo control. En modelos de infección murina se ha demostrado que el NO es responsable de la eliminación del patógeno intracelular *M tuberculosis*, en macrófagos activados (Poh, X.Y., 2022)

Estudios con ratones deficientes de iNOS, reportaron que fueron más susceptibles a una gran variedad de enfermedades infecciosas y sepsis comparados con los ratones control, lo que sugiere que la producción de NO por iNOS es necesaria para una respuesta de protección (Yang CS, Yuk JM, Jo EK, 2009).

Se ha descrito que las condiciones tisulares locales (microambiente) como citocinas y concentración de oxígeno pueden determinar la cantidad de NO tisular. Sin embargo, en el contexto de actinomicetoma se desconoce la importancia de estos mecanismos.

1.7 Activación alternativa de macrófagos (M2)

1.7.1 Receptor de manosa (CD206)

Como se mencionó anteriormente los macrófagos M2 expresan la molécula CD206, también conocido como receptor de manosa C tipo 1 (MRC1), es una glicoproteína transmembrana de la superficie celular presente abundantemente en poblaciones seleccionadas de macrófagos y células dendríticas que normalmente se presenta en estas células, pero no en los macrófagos M1, por lo tanto, sirve como un marcador útil para identificar el fenotipo.

Dentro de sus principales funciones destacan la regulación homeostática responsable de la eliminación eficiente de moléculas que requieren una vida media-corta en circulación como las hormonas glico-proteicas sulfatadas a través del dominio rico en cisteína, colágenos a través del dominio fibronectina tipo II e hidrolasas lisosomales mediante glico-conjugados terminados en manosa, fucosa o N-acetil glucosamina de los dominios de lectina tipo C (Leteux, C. et al., 2000).

El CD206 tiene la capacidad de reconocer y unirse a patógenos, sin embargo, la contribución de esta molécula en la defensa del huésped sigue sin estar del todo clara. Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* indicaron que la expresión de CD206 por sí solo es insuficiente para inducir la fagocitosis, pero puede modular las señales inducidas por otros receptores, como Receptores Fc o tipo *Toll* (Taylor, P.R. et al., 2005).

1.7.2 Arginasa 1

La arginasa-1 (ARG-1) es un marcador que se expresa en los macrófagos activados alternativamente y es inducida principalmente por las citocinas tipo 2 como la IL-4 e IL-13 a través de la subunidad común del receptor alfa de IL-4. Cuando se incrementa la producción de Arg-1 se inhiben las funciones efectoras de los macrófagos contra patógenos intracelulares como la producción de NO por iNOS, favoreciendo la supervivencia del patógeno; regulando negativamente la inflamación en el hospedero, ya que la Arg-1 compite con iNOS por el metabolismo de L-Arginina catabolizándola en L-Ornitina que consecuentemente se transforma en L-Prolina y Poliaminas, las cuales son responsables de la producción de colágeno y proliferación celular, que participan en la disminución de la inflamación en los tejidos y su posterior remodelación tisular (Rath *et al.*, 2014).

CAPITULO 2

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En infecciones naturales y experimentales provocadas por *Nocardia brasiliensis* existe una respuesta inmune sistémica exacerbada que no es suficiente para resolver la infección y coexiste con un ambiente inmunosupresor a nivel local.

Se tiene información sobre el papel de los anticuerpos, citocinas y linfocitos en la patogenia del actinomicetoma, pero se desconoce si *Nocardia brasiliensis* es capaz de modular la expresión de genes asociados al perfil M1/M2 fuera del microambiente inmunosupresor local en la infección experimental.

CAPITULO 3

HIPÓTESIS

La expresión de genes M1 está disminuida en macrófagos peritoneales con respecto a la expresión de genes M2 en ratones con actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*.

CAPÍTULO 4

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de genes *TNFA* y *CD206* de macrófagos *peritoneales* obtenidos de ratones con *actinomicetoma* por *Nocardia brasiliensis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la actividad fagocítica por citometría de flujo de macrófagos peritoneales en ratones con *actinomicetoma* por *Nocardia brasiliensis*.
2. Evaluar la expresión de genes *TNFA* y *CD206* por RT-qPCR en macrófagos peritoneales de ratones con *actinomicetoma* por *Nocardia brasiliensis*.

CAPÍTULO 5

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales de experimentación

En el presente estudio se utilizaron ratones BALB/c hembras de 8-12 semanas de edad, el peso promedio fue de 20-25 g. Los animales permanecieron en cajas de material acrílico en un encamado de aserrín previamente esterilizado en autoclave bajo calor húmedo a 121°C/15 lbs. La temperatura ambiente de las cajas se mantuvo entre 20-25°C y su alimentación consto de nutricubos (Purina México S.A. de C.V.) así como agua destilada estéril *ad libitum*. Los ratones se mantuvieron en el área de reproducción y experimentación en bioterio libre de patógenos perteneciente al Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, UANL.

5.2 Cepa de *Nocardia brasiliensis*

La cepa que se utilizó en este proyecto fue *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1, registrada en el ATCC con el número 700358. Esta bacteria fue obtenida del Departamento de Dermatología del Hospital Universitario “José Eleuterio González”, de un paciente al que se le diagnosticó con actinomicetoma.

5.3 Preparación del inóculo de *Nocardia brasiliensis*

La cepa de *Nocardia brasiliensis* se aisló a partir de un actinomicetoma de un ratón con 45 días de infección, cultivó en caldo infusión cerebro corazón (BHI) a 37°C durante 3 días en agitación moderada Posteriormente se recuperó y se lavó la biomasa con solución salina estéril, se sometió a centrifugación 3500 rpm por 5 minutos en dos ciclos.

Enseguida se descartó el sobrenadante cristalino y la biomasa se resuspendió en 10 mL de solución salina estéril y se transfirió a un homogenizador de tejidos tipo Potter-Elvehjem estéril. Posteriormente se trituró la biomasa bacteriana hasta obtener una suspensión homogénea y obtener una concentración de 20 mg/50 µL

biomasa. Del inóculo, se inyectaron 0.05 mL en la pata trasera izquierda del ratón para inducir la infección.

5.4 Evaluación clínica del desarrollo del micetoma

La evaluación clínica se realizó de forma macroscópica; consistió en buscar las lesiones características del actinomicetoma experimental (dilatación de vasos sanguíneos, abscesos, fístulas, úlceras) y en la medición del micetoma con Vernier, esta medición se utilizó para determinar la inflamación en cm^3 mediante el uso de la ecuación elipsoidea (ancho x alto x largo de la pata) multiplicando el producto por el factor 0.5235999 (Pawelczak M. et al., 2014).

5.5 Diseño experimental

Se utilizaron 30 ratones BALB/c hembras de 8-12 semanas, divididos en 2 tratamientos (ratones no infectados y ratones infectados) distribuidos en tres días de sacrificio con una $n=5$ por día (5, 15 y 45 respectivamente) por cada tratamiento (Salinas-Carmona MC et.al., 1999).

En la tabla 2 se muestran los grupos de estudio, los días de sacrificio y el número de animales con los que se trabajó.

Día de sacrificio	Grupo 1: ratones no infectados	Grupo 2: ratones infectados
Día 1	5	5
Día 15	5	5
Día 45	5	5
total:		30 Ratones

Tabla 2. Distribución de ratones por grupos de trabajo.

5.6 Método de eutanasia

El método de eutanasia utilizado fue basado en la administración en sobredosis del anestésico Ketamina/Xilacina con 100 μ L de una proporción 10:1 (mg:mg) de la dosis de sedación establecida Ketamina/Xilacina 60/6. (American Veterinary Medical Association, 2020). Se confirmó la muerte del animal al dejar de presentar signos de anestesia que incluyen reflejo de pellizco en la cola, reflejo de pedal en miembros anteriores y traseros, reflejo de la córnea, (Kawai S, Takagi Y, Kaneko S, Kurosawa T., 2011).

5.7 Obtención de macrófagos peritoneales

Los macrófagos peritoneales se obtuvieron al día 5, 15 y 45 pos-infección de cada grupo de estudio. Para esto se llevó a cabo el sacrificio de los ratones de acuerdo con el método establecido en el punto 5.6.

Una vez sacrificados los ratones se procedió a realizar la desinfección de la zona a puncionar con alcohol al 70%, después con ayuda de unas tijeras se realizó un corte para exponer la membrana peritoneal y posteriormente se inyectaron 5 mL de medio DMEM (Invitrogen) frío en la cavidad peritoneal de los animales cuidando de no perforar ningún órgano. Se agitó durante 10 segundos al ratón y se extrajo la suspensión celular de la cavidad peritoneal.

Una vez obtenida la suspensión celular se realizó el conteo de las células totales utilizando cámara de Neubauer y se ajustó a 1×10^6 la concentración de células por mL. Posteriormente, los macrófagos peritoneales se dividieron en 2 tubos para los siguientes ensayos; un tubo se usó para la extracción de ARN (1×10^6 células) y el otro tubo para la prueba de fagocitosis (1×10^5 células).

5.8 Prueba de fagocitosis:

A partir de los macrófagos peritoneales obtenidos, se transfirieron 2×10^5 células por tubo de citometría y se aforo el tubo a 1 mL con medio DMEM (Invitrogen). Posteriormente se agregaron 25 μ L de un *stock* de perlas de poliestireno (Polyscience) con un diámetro de 6 μ m a una concentración de 80,000 perlas por

μL , ajustando a una proporción de 1:10 (es decir, 1 macrófago por cada 10 perlas de poliestireno). Después se incubaron a 37°C durante 1 hora. Concluida la incubación, se centrifugaron las células a 1,500 rpm por 5 minutos a 4°C , se decantó el sobrenadante y enseguida se resuspendieron en 200 μL de PBS con formaldehído al 2% (pH 7,2) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavan las células centrifugando a 1500 rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante y se agregó 1 μL del anticuerpo F4/80-PE (eBioscience) solo a los tubos marcados como duplicados dejando un tubo control sin la adición de anticuerpo. Se incubaron en oscuridad durante 20 minutos y se agregó 1 mL de buffer de fosfatos pH: 7.2 para después centrifugarlo a 1500 rpm por 5 minutos con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo. Se decantó el sobrenadante y por último se agregan 250 mL de PBS fresco con formaldehído. Los tubos se agitaron en vórtex durante 10 segundos y se procedió a realizar la adquisición de la muestra para realizar la prueba de fagocitosis utilizando el citómetro de flujo LSR Fortessa (BD). Como grupo control se utilizaron células incubadas a 37°C durante 1 hora en ausencia de perlas de poliestireno (Polyscience).

5.9 Estrategia de análisis para ensayo de fagocitosis por citometría de flujo

- 1) Se realizó el análisis de eventos arrojados con base a los parámetros de complejidad y morfología correspondientes (SSC-A y FSC-A respectivamente) y seleccionar el *singulete* para la población de interés.
- 2) Enseguida se identificó en un *dot plot* la región correspondiente a las células peritoneales que fagocitaron las perlas, respecto al área de las perlas y a la región que representaba las células peritoneales.
- 3) A partir del cuadrante que contenía las células que fagocitaron, se cambió el canal de (SSC-A) por el de F4/80-PE (eBioscience) con el fin de identificar la señal del fluorocromo de PE-A y diferenciar las células (+) para F4/80, un miembro típico de la familia de receptores EGF-TM7 utilizado como marcador específico para macrófagos peritoneales (Kloc, M., 2017). La identificación de la señal (+) se realizó a través de una condición control con perlas más anticuerpo F4/80-PE (eBioscience)

sin células peritoneales y otra condición de control que contenía células peritoneales con anticuerpo F4/80-PE (eBioscience) sin perlas. La señal (+) se estableció a un valor igual o superior a 10^3 mediante el análisis de la señal de los histogramas correspondientes a cada uno de los tubos control descritos anteriormente. Sin embargo, la señal del fluorocromo F4/80-PE consistía en 2 regiones las cuales expresaban una intensidad de señal alta y una región de intensidad de señal baja que clasificamos como señal Alta (High) y Baja (Low) para el anticuerpo, es decir F4/80^{High} que corresponde a los macrófagos peritoneales grandes (LPM) y F4/80^{Low} que corresponde a los macrófagos peritoneales pequeños (SPM).

4) Después de haber seleccionado el cuadrante de células (+) a F4/80 PE (eBioscience) se despliega un siguiente *gate* en donde se cambia el canal de F4/80 PE a (FSC-A) y aquí con base a (SSC-A) se diferencian las células (+) F4/80 PE-A fagocíticas del resto de las células (+) F4/80 que no fagocitaron.

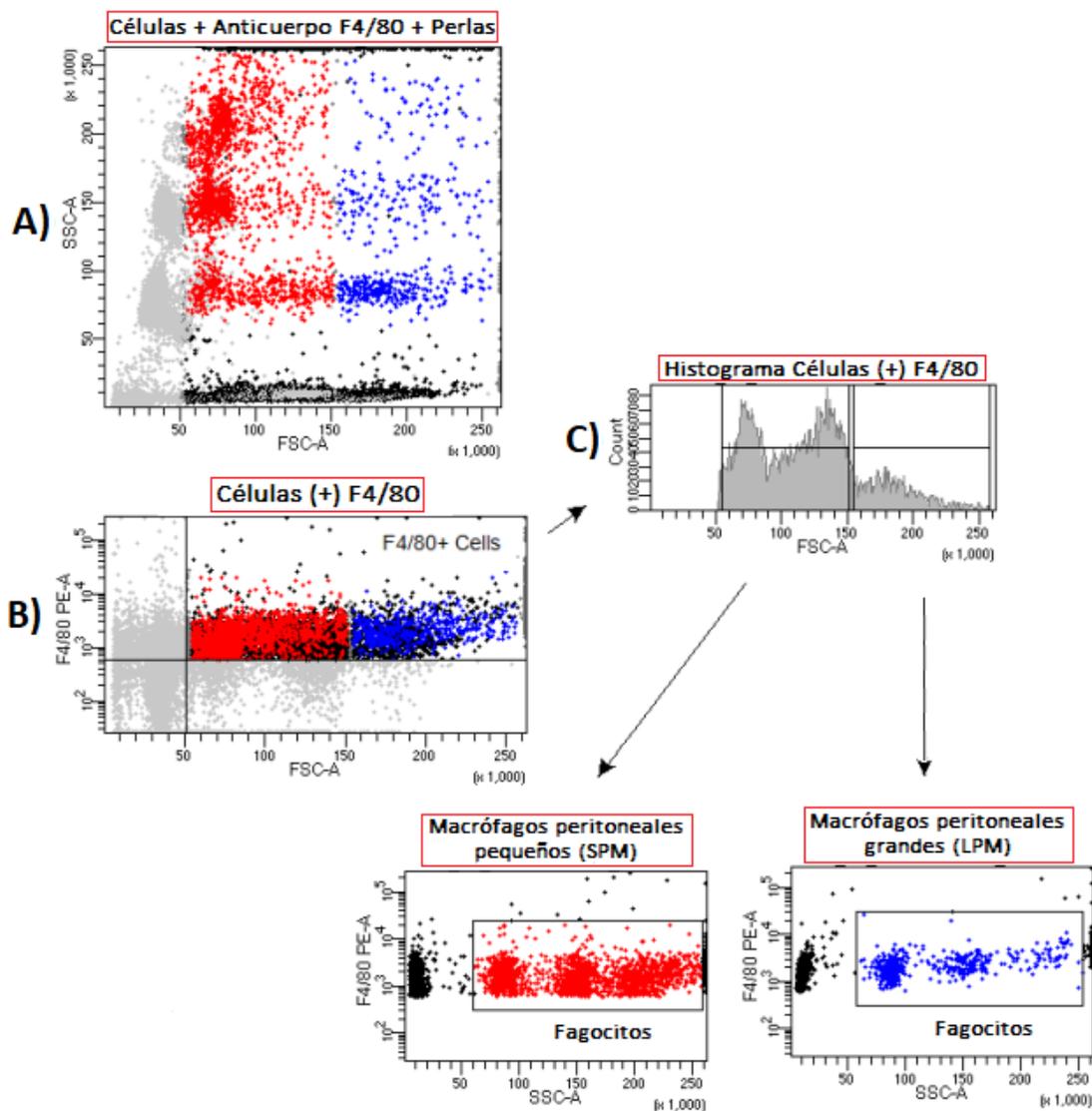


Figura 5. Estrategia de análisis para la identificación de macrófagos peritoneales en base a los parámetros de complejidad (SSC-A) tamaño (FSC-A) y expresión de F4/80. En el panel A) Se observan un *dot plot* de las características de tamaño vs complejidad de los macrófagos que se incubaron con las perlas y que se marcaron con el anticuerpo anti-F4/80 PE, en el panel B) *dot plot* representativo de macrófagos peritoneales (+) a F4/80 vs tamaño. C) histograma de las células F4/80 (+); a partir de aquí se dividen en dos subpoblaciones: los macrófagos peritoneales pequeños (SPM) y los macrófagos peritoneales grandes (LPM). Se determinan los porcentajes de células (+) a F4/80 y con capacidad de

fagocitosis a través de la selección de las poblaciones celulares que desplieguen características de mayor complejidad y tamaño respecto a las condiciones control.

5.10 Evaluación de la expresión de *TNFA* y *CD206* en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c por RT-qPCR.

5.10.1 Obtención del control (+) de genes proinflamatorios y antiinflamatorios en macrófagos de bazo:

A partir de ratones BALB/c con actinomicetoma de 45 días y de un grupo control de no infectados se realizó la extracción del bazo mediante disección utilizando pinzas y tijeras esterilizadas por autoclave a 121°C-15 lbs de presión durante 15 minutos. Al inicio del proceso se desinfectó el área peritoneal con alcohol al 70%; se retiró la capa de piel y músculo para acceder a la cavidad peritoneal y extraer el bazo; enseguida se colocó en cajas de Petri que contenían 10 mL de medio DMEM (Invitrogen) estéril a temperatura ambiente y se disgregó en pequeños trozos de tejido con ayuda del embolo de una jeringa de 1 mL hasta que se obtuvo una suspensión celular homogénea. El tejido se centrifugó a 3500 RPM por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en el líquido residual. Se agregaron 5 mL de buffer de lisis (NaCl 5 % estéril y frío) y se incubó por 5 minutos en agitación leve; para detener la lisis se aforó la suspensión celular a 15 mL con PBS estéril. Se centrifugó la suspensión celular a 3500 RPM por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en el líquido residual y se agregaron 10 mL de medio DMEM (Invitrogen) a las células de bazo que provenían de ratones con actinomicetoma y 5 mL para las células de bazo de ratones control. Se realizó el conteo de células con la cuenta en cámara de Neubauer y se ajustaron las células a 1×10^6 por mL.

5.10.2 Cultivo de macrófagos derivados de bazo de ratones con actinomicetoma

Las células obtenidas se colocaron en placas de cultivo de poliestireno de 12 pozos (Costar) se dejaron adherir por 2 h y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido

el tiempo se retiró el sobrenadante de los pozos de cultivo y se lavaron las células con medio DMEM (Invitrogen) a temperatura ambiente.

Enseguida se despegaron las células por pipeteo y se les agregó 300 µL de Trizol-Cloroformo (Life Technologies, EE.UU.) para realizar extracción de ácidos nucleicos.

En el caso de macrófagos derivados de bazo de ratones no infectados se estimularon con 1 mL de LPS (Sigma, Life Science) a una concentración de 100 µg/mL y con 1 mL de IL-10 (Thermo Scientific) a una concentración de 25 ng/mL durante 4 horas. Al término de la incubación se lavaron las células y se agregaron 300 µL de Trizol-Cloroformo (Life Technologies, EE.UU.) para someterse al siguiente proceso de extracción de mRNA.

5.10.3 Extracción de mRNA

Una vez recolectados los macrófagos de la cavidad peritoneal (1×10^6 células) se mezclaron con 300 µL de reactivo Trizol-Cloroformo frío (Life Technologies, EE.UU.) y se homogenizó por pipeteo, se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente para después realizar los pasos de extracción de RNA con sus volúmenes correspondientes, ver tabla 3. Posteriormente se agregaron 300 µL de cloroformo frío (Sigma), se agitó en vortex y se incubó por 3 minutos. Después se centrifugó a 21148 RPM (12,000 xg) durante 15 minutos, posteriormente se separó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo. Se agregaron 150 µL de isopropanol frío (Sigma, Life Science), se dejó incubar por 10 minutos. Una vez terminada la incubación se centrifugó a 21148 RPM (12,000 xg) por 10 minutos, se retiró el sobrenadante tomando precaución de no remover el pellet de ARN en la base del tubo y se agregó a este mismo 300 µL de etanol frío (Sigma, Life Science) al 75%, se agitó en vortex y se centrifugó a 16719 RPM a (7,500 xg) por 5 minutos para obtener un pellet de ARN. Una vez realizado el paso anterior se dejó el tubo destapado dentro de la campana de flujo laminar por 10 minutos, finalmente se resuspendió el pellet en 30 µL de agua DEPC (Sigma). Una vez pasado el tiempo se tapa el tubo y se coloca en Thermoblock a 55°C por 10 minutos para su cuantificación por espectrofotometría.

Extracción de ARN		
Reactivo	Marca	Volumen por reacción
Trizol	Ambion Life Technologies	300 µL
Cloroformo	Sigma-Aldrich	200 µL
Isopropanol	Sigma-Aldrich	500 µL
Etanol	Sigma-Aldrich	1000 µL
Agua DEPC	Sigma	30 µL

Tabla 3. Volúmenes de reactivos para extracción de ARN

La cuantificación y pureza del ARN se realizó mediante espectrometría usando el Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Se utilizaron alícuotas de 1 µL. Se utilizaron los valores de la relación de A260/280 entre 2.0 y 2.2 para considerar una muestra de RNA con pureza óptima, valores de A260/280 > 1.7 pureza aceptable, muestras con valores < 1.7 se consideró como muestra contaminada por compuestos aromáticos.

La retrotranscripción se realizó con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), para el cual se ajustaron los volúmenes necesarios por reacción descritos en la tabla 4; utilizando 1 µg de ARN total por reacción. La reacción se realizó en un volumen de 20 µL en un termociclador (MJ Research/PTC-200) de acuerdo con el siguiente programa: 1 ciclo: 25°C por 10 minutos, 2 ciclo: 37°C por 120 minutos, 3 ciclo: 85°C por 5 minutos, 4 ciclo a 4°C indefinidamente. Una vez terminada la retrotranscripción se cuantifico la cantidad de ADN complementario (ADNc) mediante espectrofotometría utilizando Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Se determinó la concentración y la calidad del ADN obtenido a una longitud de onda de 260 nm. Se consideró la relación A260/280 con valores óptimos de pureza de 1.8 a 2.0; valores de A260/280 > 1.6 se consideraron como aceptable y < 1.6 se consideraron como muestras con posible contaminación por fenoles y proteínas. También se consideró la relación A260/230 con valores de 1.8-2.0 para la evaluación de pureza.

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit		
Reactivo	Marca	Volumen por reacción
10x RT Buffer	Applied Biosystems	2 mL
MultiScribe Reverse Transcriptase 50 U/MI	Applied Biosystems	1 µL
10x RT Random Primers	Applied Biosystems	2 µL
dNTP Mix 100 Mm	Applied Biosystems	0.8 µL
H2O DEPC	Sigma	4.2 µL

Tabla 4. Volúmenes de reactivos por reacción.

Una vez obtenido el ADNc se procedió a realizar la amplificación semi cuantitativa de los genes de interés utilizando las secuencias de *primers* descritas en la tabla (5) con las temperaturas de alineamiento correspondientes utilizando una concentración final de 500 nM. El volumen de reacción utilizado fue de 10 µL que contenían 200 ng de ADN complementario y el marcador SYBR Green. (SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems). Se utilizó un termociclador tiempo real CFX96 Touch (Bio-Rad) bajo el siguiente programa: 1° Ciclo: 95°C por 10 minutos, 2° Ciclo: 95°C por 15 segundos, 3°Ciclo: 63°C por 1 minuto, 4°Ciclo: 95°C por 10 segundos, 5° Ciclo: 55°C por 5 segundos y 6°Ciclo: 95°C por 50 segundos.

Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se normalizaron con base a la expresión del gen endógeno (RNA18s) con el método propuesto por Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak, K. J., & Schmittgen, T. D., 2001).

<u>Genes</u>	<u>Secuencias</u>		<u>Temperatura</u>
	<u>Forward</u>	<u>Reverse</u>	<u>Alineamiento</u>
<u>TNFA</u>	<u>5-CCACATCTC CCTCCAGAAAA-3'</u>	<u>5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3'</u>	<u>62.4</u>
<u>CD206</u>	<u>5'-TTCAGCTATTGGACGCGAGG-3'</u>	<u>5'-GAATCTGACACCCAGCGGAA-3'</u>	<u>65.2</u>
<u>18S</u>	<u>5'-CGGCGACGACCCATTCTGAAC-3'</u>	<u>5'-GAATCGAACCCCTGATTCCCCGTC-3'</u>	<u>62.4</u>

Tabla 5. Secuencias de *primers* para la RT-qPCR

5.11 Análisis estadístico

El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism versión 5. Se utilizó la prueba Kolmogorov-Smirnov para evaluar el tipo de distribución de los datos. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis Anova de 1 vía con Post test Dunn para datos no paramétricos. La significancia estadística tomo un valor de $*p \leq 0.05$ como estadísticamente significativo. n= 3).

5.12 Análisis e interpretación de la información

La adquisición de los macrófagos peritoneales, expresión de F4/80 y ensayo de fagocitosis se realizó utilizando el citómetro de flujo LSRFortessa, (Becton Dickinson). Para el análisis de la expresión relativa para los genes *TNFA* y *CD206* se utilizó el termociclador en tiempo real CFX96 Touch de BioRad.

El análisis e interpretación de los resultados estuvo a cargo de:

Dr. C. Mario César Salinas Carmona (Investigador Principal)

Dra. C. Nallely López López (Codirector)

Dra. C. María de los Ángeles Castro Corona (Miembro de la comisión)

Q.B.P. Tomás Alejandro Suárez Vázquez (Tesisista de Maestría)

CAPÍTULO 6

RESULTADOS:

6.1 Evaluación clínica del micetoma:

Una vez que se realizó la infección en los ratones BALB/C, se evaluó el tamaño de la lesión como una de las características clínicas del micetoma. En la figura 6 se muestran las dos fases características del establecimiento del actinomicetoma; en la primera la inflamación alcanza valores de 0.3 mm al día 5 (inflamación aguda) pero disminuyen al día 15 y 21; sin embargo, en el día 28 hay un incremento de la inflamación que se mantiene hasta el día 45 posterior a infección (inflamación crónica) que es característico del establecimiento del actinomicetoma.

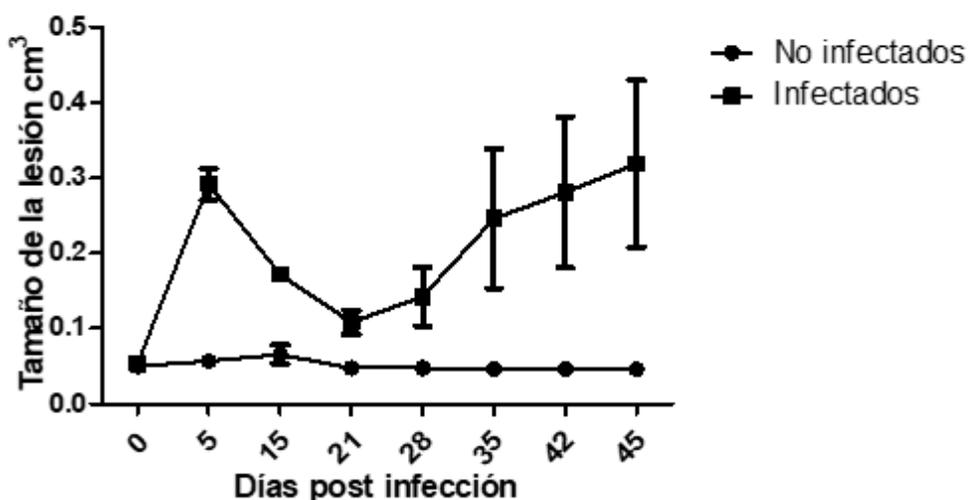


Figura 6. Evolución clínica del actinomicetoma. En la figura se observa el incremento de la inflamación macroscópica medida en cm^3 del grupo de ratones que se infectaron y que desarrollaron micetoma (■) respecto al grupo control (●). En la figura 7 observamos una comparación del miembro posterior izquierdo de un ratón infectado con *Nocardia brasiliensis* con desarrollo de actinomicetoma al día 45 posterior a infección (Panel C-D) contra el miembro posterior izquierdo de un ratón no infectado, al que solo se le inoculó solución salina como control negativo al día 45 (Panel A-B).



Figura 7. Miembro anterior izquierdo de un ratón BALB/c sin infección (panel A y B) y con Infección por *Nocardia brasiliensis* que desarrollo Micetoma (panel C y D).

6.2 Evaluación del porcentaje de fagocitosis de los macrófagos peritoneales obtenidos de ratones con actinomicetoma.

Los macrófagos peritoneales se obtuvieron como se mencionó previamente en la sección de materiales y métodos. Se identificaron por citometría de flujo con base a los parámetros de complejidad y tamaño correspondientes (SSC-A y FSC-A respectivamente) y se seleccionó el singulete que representa las células de interés. Se seleccionó la región correspondiente a las células peritoneales capaces de fagocitar, esto con base al tubo control que contenía solamente las células sin marcar donde se muestra su tamaño y complejidad basal sin fagocitar perlas y el tubo control que contenía perlas con células peritoneales con marca (Anticuerpo F4/80-PE) los cuales permitieron identificar la región correspondiente a las perlas, células peritoneales y células que fagocitaron las perlas. Al realizar la comparación de la capacidad fagocítica de las células F4/80 (+) obtenidas de los ratones infectados y del grupo control, no observamos diferencias significativas en los

porcentajes de fagocitosis en ninguno de los días posteriores a infección (Días 5, 15 y 45) Ver Figura 8.

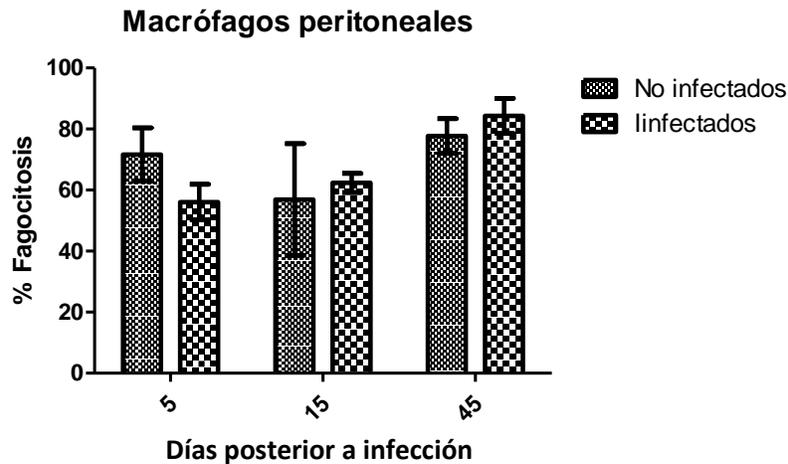


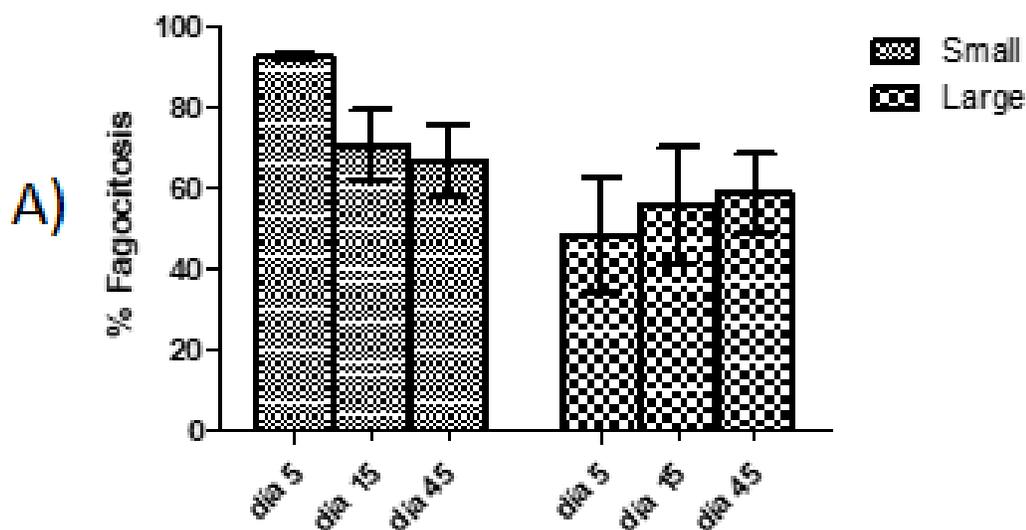
Figura 8. Porcentajes de fagocitosis de macrófagos peritoneales (+) para F4/80. La capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales que desarrollaron actinomietoma se mantiene casi al mismo nivel que los macrófagos del grupo control. No hay diferencia en el porcentaje de fagocitosis entre el grupo de ratones No infectados respecto al grupo de ratones que fueron infectados y que desarrollaron actinomietoma. (Kruskal-Wallis Anova de 1 vía con Post test Dunn, * $p \leq 0.05$ estadísticamente significativo. $n = 3$).

Al no encontrar diferencias en el porcentaje de fagocitosis, revisamos en la literatura otra forma de análisis y encontramos que en la cavidad peritoneal existen dos subtipos principales de macrófagos distintos en tamaño y marcadores fenotípicos específicos; el primer grupo se conoce como *Large Peritoneal Macrophages* (LPM) los cuales expresan altos niveles de F4/80^{Hi}, CD11b^{Hi} pero carecen de MHCII; por otra parte *Small Peritoneal Macrophages* que expresan niveles más bajos de F4/80^{Low}, CD11b^{Low} y , pero niveles más altos de MHCII (Cassado Ados A et. al., 2015).

Decidimos comparar el porcentaje de fagocitosis de los macrófagos peritoneales en base al grado de expresión del marcador F4/80 en Low y High que de manera

indirecta representan las dos principales subpoblaciones de estas células (SPM y LPM). En la figura 9, Panel A se muestra el porcentaje de fagocitosis de los macrófagos peritoneales provenientes de ratones no infectados a diferentes tiempos; y no se observa diferencia significativa para los SPM ni para la de los LPM en los días posteriores a su inoculación con solución salina (Día 5, 15 y 45). En la figura 9 Panel B se muestra un aumento en el porcentaje de fagocitosis con relación al tiempo para los LPM, se observa diferencia significativa entre los días 5 y 45 así como entre los días 15 y 45 posteriores a infección en macrófagos peritoneales provenientes de ratones infectados con *Nocardia brasiliensis*. En la misma figura 9 panel B, se observa también una capacidad de fagocitosis mayor de los SPM con relación a los LPM.

Macrófagos peritoneales provenientes de ratones no infectados



Macrófagos peritoneales provenientes de ratones infectados

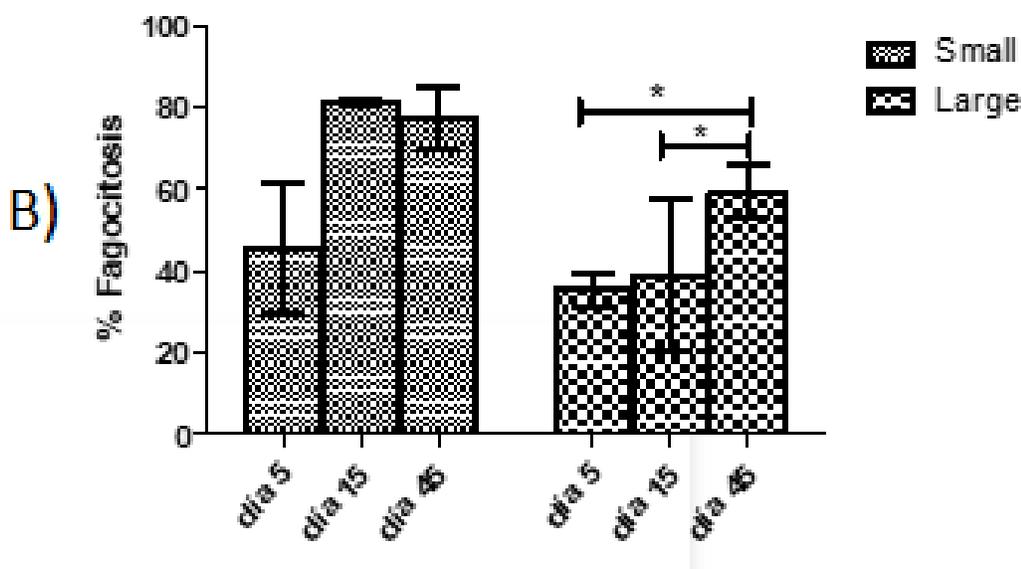


Figura 9. Porcentaje de fagocitosis de macrófagos peritoneales en base al nivel de expresión del marcador F4/80. Panel A, no se observa diferencia significativa en el porcentaje de fagocitosis para los SPM ni para la de los LPM en los días posteriores a su inoculación con solución salina (Día 5, 15 y 45). Panel B, se observan cambios solamente en los macrófagos que son F4/80^{Hi} (LPM), donde

existe diferencia significativa entre los días 5 y 45 así como los días 15 y 45 posteriores a infección. El porcentaje de fagocitosis de los (SPM) es mayor en los 3 días posteriores a infección con relación a los porcentajes de fagocitosis de los (LPM). (Kruskal-Wallis Anova de 1 vía con Post test Dunn, * $p=0.05$ estadísticamente significativo. $n=3$).

6.3 Evaluación de la expresión de, *TNFA* y *CD206* en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c por RT-PCR.

Obtención de control (+) de amplificación para los genes *TNFA*, *CD206*

Se decidió utilizar cADN de macrófagos de bazo de ratones con actinomicetoma como control de amplificación de genes inflamatorios y de ratones no infectados pero estimulados con LPS e IL-10 como control pro y antiinflamatorio respectivamente. En la figura 10 se muestra la curva de amplificación de los genes *TNFA* y *RNA18s*, pero no del *CD206*.

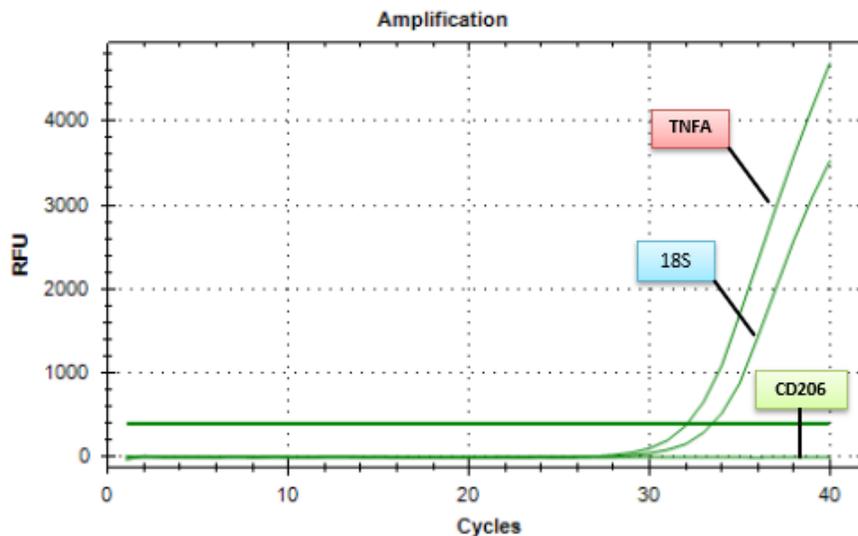


Figura 10. Curva de amplificación de los genes *RNA18s*, *TNFA* y *CD206* en macrófagos de bazo provenientes de ratones infectados con *Nocardia brasiliensis* al día 45 posterior a infección.

Enseguida evaluamos la expresión de los mismos genes, pero ahora en macrófagos peritoneales sin infección pero que fueron estimulados con LPS o IL-10; en la figura 11 se presentan las curvas de amplificación de los genes RNA18s en el panel A), de *TNFA* en el panel B) con Ct menores a 30 y en el gen *CD206* amplifica en Ct 30 panel C).

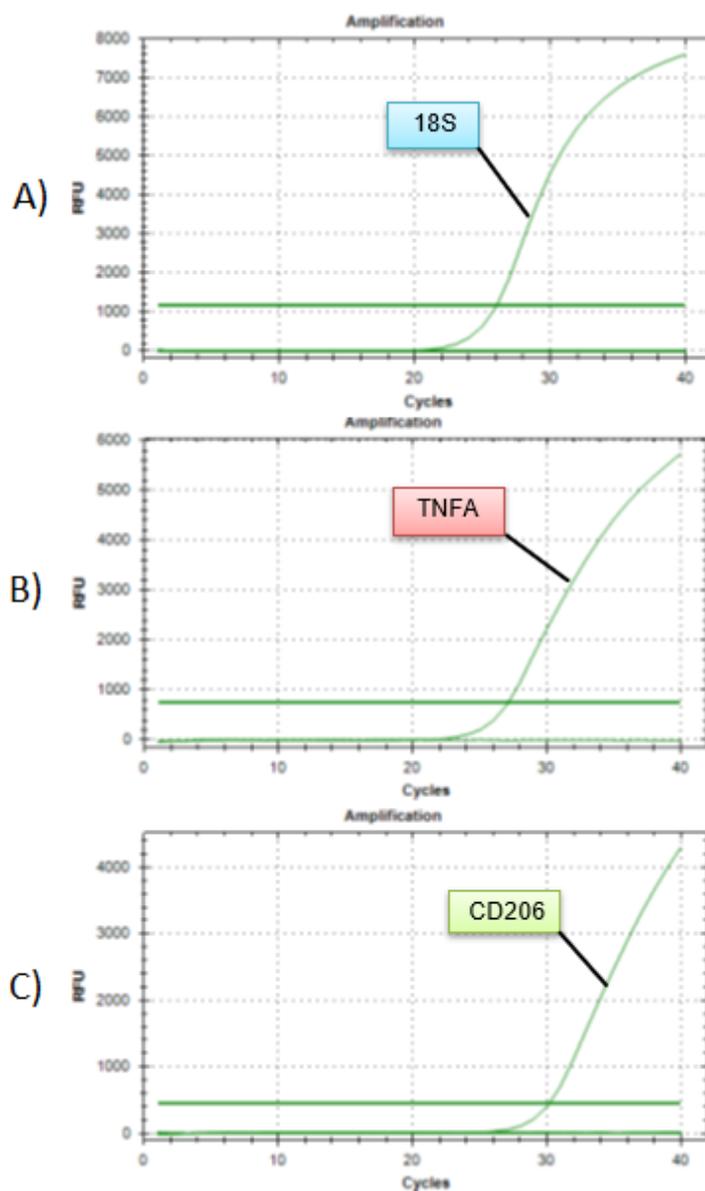


Figura 11. Curvas de amplificación de los genes *RNA18s*, *TNFA* y *CD206* en macrófagos de bazo estimulados *in vitro* con LPS (100 ug/mL) e IL-10 (25 ng/mL). A) Gen *RNA18s*. B) Gen *TNFA* y C) *CD206*

Una vez que determinamos el correcto funcionamiento de los *primers* y de la técnica de RT-qPCR, proseguimos a realizar la búsqueda de la expresión de los genes *TNFA* y *CD206* en macrófagos peritoneales de ratones con actinomietoma que se asocian al fenotipo M1 y M2 respectivamente. En la figura 12 se presentan los resultados, del lado izquierdo se observa que el gen *TNFA* (fenotipo M1) no amplifica en las condiciones de 5, 15 y 45; del lado derecho para el caso del Gen *CD206* tampoco amplificó en las condiciones ensayadas. En ambos casos sí vemos expresión del gen endógeno RNA18s en ciclos muy tempranos, lo que sugiere que los genes de interés no se expresan en los macrófagos peritoneales; por lo menos en las condiciones evaluadas.

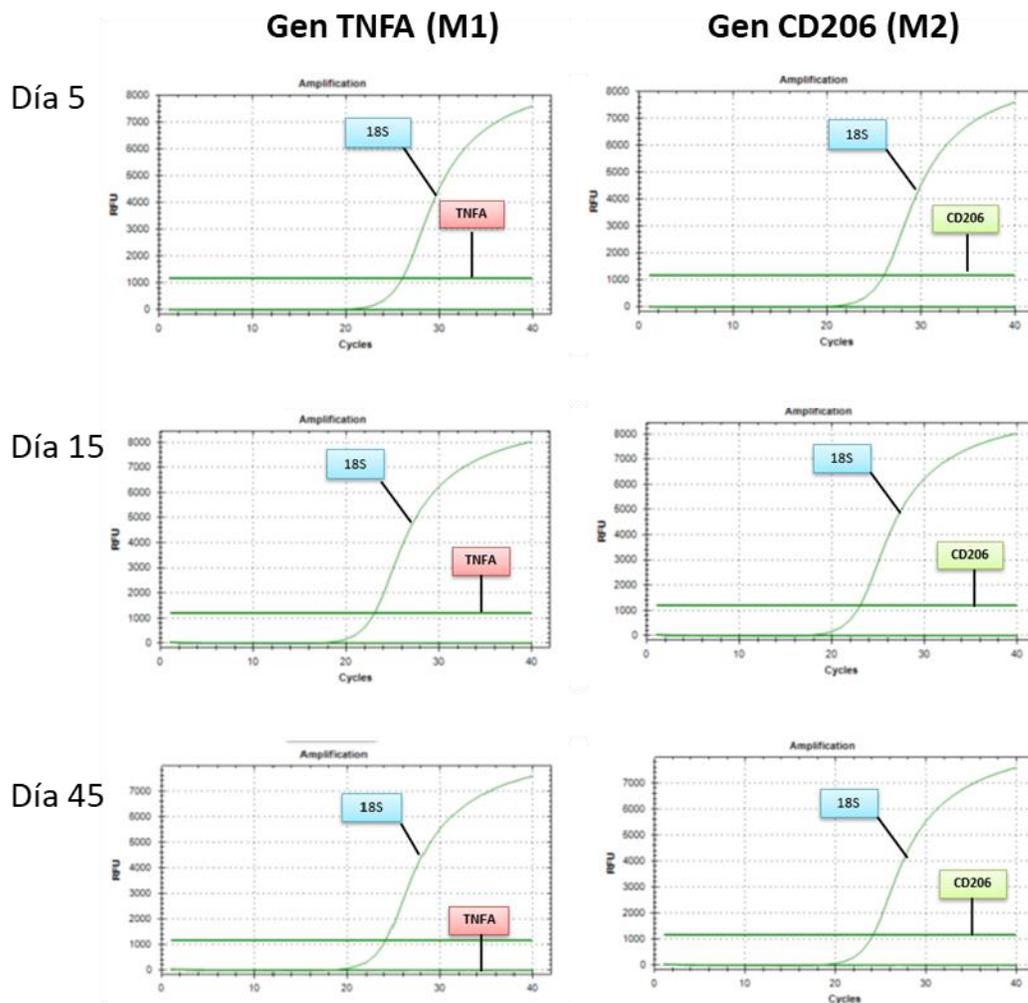


Figura 12. Curvas de amplificación de los genes asociados al perfil M1/M2 en macrófagos peritoneales provenientes de ratones infectados con *Nocardia*

***brasiliensis* en los días 5, 15 y 45 posterior a infección. En la evaluación de la amplificación del gen pro y antiinflamatorio no encontramos expresión en ningún tiempo ensayado, pero sí amplificó el gen endógeno RNA18s.**

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN:

El actinomicetoma es una enfermedad infecciosa se adquiere por inoculación traumática de determinadas bacterias como *Nocardia brasiliensis* en el tejido subcutáneo (OMS, 2022).

La reproducción de la infección por actinomicetoma en ratones experimentales ha sido de gran ayuda para comprender la respuesta inmune humoral y celular contra esta bacteria (Salinas Carmona MC, 1999). Previos estudios han reportado que *Nocardia brasiliensis* induce un entorno proinflamatorio y antiinflamatorio local que resulta en la polarización de los macrófagos, lo que sugiere que pueden ser la base de la patología (Meester I. et al, 2013). Sin embargo, se desconoce si *Nocardia brasiliensis* modula la respuesta sistémica a nivel de macrófagos peritoneales. Para abordar esta pregunta, utilizamos el modelo de actinomicetoma experimental desarrollado por (Salinas Carmona MC, 1999) el cual fue replicado con éxito como se observa en la figura 6 donde evaluamos el grado de inflamación macroscópica y observamos una primera fase de inflamación aguda que se presentó al día 5, 7 posterior a la infección caracterizada por enrojecimiento, tumoración y un reclutamiento intenso de granulocitos altamente concentrados en múltiples microabscesos con límites no definidos. Hacia el día 10 se presenta un número creciente de macrófagos en la periferia de la lesión y el desarrollo de histiocitos de aspecto espumoso característico de la etapa aguda (Welsh, O., Vera, C. L. & Salinas, M. C., 2007); sin embargo la inflamación disminuye en los siguientes días hasta el establecimiento de la segunda fase de inflamación crónica que va desde el día 28 y se mantiene hasta el día 45 post infección; en esta fase el incremento en el grado de inflamación corresponde a una reacción inflamatoria granulomatosa la cual desarrolla abscesos con un abundante contenido de gránulos compuestos por filamentos del patógeno, células mononucleares (monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos, células espumosas) con una capa externa de fibroblastos y colágena (Welsh, O., Vera, C. L. & Salinas, M. C., 2007).

El establecimiento del actinomicetoma experimental nos proporciona un contexto inflamatorio local en el miembro anterior izquierdo del modelo animal para poder evaluar la respuesta sistémica a nivel de macrófagos de la cavidad peritoneal. Una de las principales funciones de los macrófagos es la fagocitosis, como uno de los mecanismos principales que contribuye a la homeostasis tisular para eliminar células envejecidas o patógenos que alteren la homeostasis peritoneal. Por lo tanto, decidimos evaluar el porcentaje de macrófagos peritoneales que fagocitaron las perlas de látex, sin embargo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas, por lo tanto, decidimos utilizar el grado de expresión del marcador específico de macrófagos peritoneales en F4/80^{Hi} y en F4/80^{Low}. Lo anterior debido a que (Ghosn et al., 2010) reportan que en la cavidad peritoneal de ratones existen células B, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, neutrófilos, células T, *natural killer* (NK) y células NKT invariantes, además de 2 subtipos de macrófagos con una expresión diferencial del marcador F4/80 en ratones *naïve*; los primeros son los más abundante de estas subpoblaciones, se conocen como macrófagos peritoneales grandes (LPM), tienen un tamaño de 11.56 μm y se caracteriza por la expresión de moléculas de superficie como CD11b^{Hi} y F4/80^{Hi}, pero carecen de MHC-II; la segunda subpoblación es conocida como macrófagos peritoneales pequeños (SPM), cuentan con tamaño de 8.16 μm y expresa marcadores como CD11b^{Low}, F4/80^{Low} pero niveles más altos de MHC-II (Ghosn et al. 2010; Cassado Ados et al. 2011, 2015).

En la figura 9 se muestran los resultados que muestran el porcentaje de fagocitosis de macrófagos peritoneales con base al tamaño y al nivel de expresión del marcador F4/80, En el panel 9A, no se observa diferencia significativa en ninguno de los días posteriores a la inoculación con salina tanto en F4/80^{Low} (SPM) como en F4/80^{Low} (LPM) provenientes de ratones no infectados, en la figura 9B, al comparar la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales con base a su nivel de expresión del F4/80 observamos que los F4/80^{Low} (SPM) tienen una mayor capacidad de fagocitosis con un promedio cercano al 80 % en los días 15 y 45 posteriores a infección en relación con el grupo de F4/80^{Hi} (LPM) los cuales tienen

un máximo porcentaje de fagocitosis en el día 45 posterior a infección. Lo anterior concuerda con el trabajo de (Cassado Ados et al., 2011) ya que describe que los macrófagos peritoneales pequeños parecen tener una mayor función de fagocitosis que los macrófagos peritoneales grandes y esto se confirma mediante los datos presentados por (Ghosn et al., 2019) en donde reportan que mediante un análisis por citometría de flujo evaluaron la capacidad de fagocitosis de macrófagos peritoneales de ratón y determinaron que la capacidad de fagocitosis de los SPM fue mayor que la de los LPM, con base a los resultados de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) proveniente de la cepa de *E.coli* fagocitada que expresaba una proteína verde fluorescente.

La segunda observación destacable de la Figura 9B, es que los LPM procedente de ratones infectados con *Nocardia brasiliensis* presentan un aumento en su capacidad de fagocitosis con relación al tiempo, es decir que a medida que avanzaban los días posteriores a infección se podría observar un aumento en su capacidad de fagocitosis, encontrando diferencia significativa entre el día 5 y 45 posterior a infección y entre el día 15 y 45. Una explicación plausible a este fenómeno es el aumento de ácido retinoico en sangre, ya que según lo descrito por (M. G. Derebeet et al., 2014) durante infecciones bacterianas se libera proteína sérica amiloide (SAA) la cual es una proteína que transporta retinol procedente del hígado, la cual al estar en circulación llega a diferentes órganos y tejidos como es el caso del tejido adiposo asociado al peritoneo (Omentum). En ratones, el omentum consiste solamente en una franja grasa con un tamaño pequeño con orientación antero-ventral al estómago (Cohen CA et al., 2013). El omentum se destaca por la presencia de células estromales las cuales expresan enzimas convertidoras de Acido Retinoico abundantemente (Maruya M., 2011), y es en esta interfase al peritoneo donde el Retinol que llega procedente del hígado en circulación se transforma en Retinal mediante la enzima Alcohol Deshidrogenasa 3 (ADH3) y después pasa de Retinal a Acido Retinoico por acción de la Retinaldehido Deshidrogenasa (RALDH2), (Maruya M., 2011).

Una vez que el Acido Retinoico difunde desde el Omentum hacia al peritoneo, entra en contacto con los macrófagos residentes en donde estimula la expresión de GATA6 lo cual se encuentra facilitado gracias a una modificación epigenética en la histona H3K4me3 en el locus GATA6 de macrófagos peritoneales residentes que facilita la expresión activa de GATA6 impulsada por este metabolito (Okabe y Medzhitov, 2014). GATA6 es un factor de transcripción con atribuciones de control maestro identificado en macrófagos peritoneales, ya que una diversidad de funciones fisiológicas depende de su activación, lo que determina el mantenimiento homeostático del peritoneo.

Dentro de las diferentes funciones de GATA6 destacan el reemplazo de los macrófagos peritoneales residentes PRM durante la resolución de la inflamación, así como controlar la secreción de IL-10 y TGF- β que es clave en la producción de IgA independiente del tejido linfoide asociado al intestino por parte de las células peritoneales B-1 para combatir la infección (Okabe y Medzhitov, 2014) así como el aumento de la fagocitosis la cual es la función que nos interesa en este trabajo.

Respecto a la evaluación de la expresión del gen proinflamatorio como *TNFA* y antiinflamatorio como *CD206* en macrófagos peritoneales provenientes de ratones infectados con *Nocardia brasiliensis*, no se encontró la expresión de los transcritos de interés; corroboramos el correcto diseño de los primer y de la técnica utilizando macrófagos de bazo estimulados con LPS como control (+) para la amplificación del TNF-a (ver figura 11-B) así como la estimulación con IL-10 como control (+) de amplificación para *CD206* (ver figura 11-C); además utilizamos el RNA18s como gen endógeno el cual como era de esperarse sí fue detectado en todas las muestras de macrófagos peritoneales en los diferentes grupos y condiciones evaluadas, dado que se utiliza como un gen de referencia interno que no varía independientemente del tratamiento y que muestra niveles de expresión abundantes y relativamente constantes (Kuchipudi, Suresh V et al., 2012).

De acuerdo con lo anterior se sugiere que los macrófagos peritoneales no expresan los genes asociados al perfil M1/M2 cuando el estímulo infeccioso se localiza fuera

del peritoneo. Estudios muestran que los macrófagos peritoneales murinos sí producen diferentes patrones de citocinas inflamatorias siempre y cuando sean estimulados *in vivo* directamente en peritoneo o *in vitro* (Turchyn LR, et al., 2007).

Una probable causa de la falta de estimulación en peritoneo hacia los macrófagos es que *Nocardia brasiliensis* se encuentra recluida dentro de los granulomas en el sitio local de la infección, el cual se constituye de macrófagos, células gigantes multinucleadas, células espumosas, células plasmáticas y linfocitos rodeados por una cápsula de tejido fibroso o colágena que actúa como una barrera física de contención que evita la diseminación del patógeno, el reconocimiento y la activación de genes pro y antiinflamatorios (Treviño Villarreal H. 2009).

Sin embargo, existe la posibilidad de que una parte de la carga bacteriana utilizada en el modelo experimental de actinomicetoma pudiera escapar y ser retenida en los ganglios linfáticos más cercanos al sitio de infección; en este caso pudieron ser retenidos en los ganglio Poplíteos, como lo demuestran resultados previos no publicados (Téllez Dorado J.R., 2019) donde evidencia la presencia de *Nocardia brasiliensis* a nivel local en el cojinete plantar durante la etapa aguda de la infección así como en un estado latente en la etapa crónica. En ganglio poplíteo solo se detectó la presencia de esta bacteria en la etapa aguda hasta el día 7 posterior a la infección. Por el contrario, al analizar el bazo como control de la diseminación sistémica del patógeno no encontró presencia de Unidades Formadoras de Colonias en ninguno de los días posteriores a la infección, (Téllez Dorado J.R., 2019).

Sin embargo, no se descarta que los antígenos bacterianos si pudieran lograrlo, esta hipótesis fue comprobada a través del aislamiento de macrófagos de bazo de ratones infectados con *Nocardia brasiliensis* al día 45 posterior a la infección donde evaluamos la expresión de *TNFA* y *CD206*, encontrando solamente expresión del gen *TNFA* en estas células y ausencia de la expresión del gen *CD206*, por lo cual podemos definir que los macrófagos de bazo procedentes de ratones infectados con *Nocardia brasiliensis* expresan un fenotipo parcialmente proinflamatorio pero no uno antiinflamatorio.

De acuerdo con los resultados presentados, podemos inferir que existe una respuesta inmune variable contra el patógeno *Nocardia brasiliensis*; por una parte a nivel local en el sitio de infección (actinomicetoma) se encuentra coexistiendo una respuesta proinflamatoria con una respuesta antiinflamatoria (Meester I. et al, 2013) y a nivel sistémico en peritoneo una ausencia de respuestas relacionados al fenotipo M1 o M2. Sin embargo, ambos sitios comparten comunicación con órganos linfoides secundarios como son el ganglio poplíteo y el bazo los cuales funcionan como filtros del patógeno y sus antígenos funcionando como una especie de “puntos de control” en donde son retenidos. Esto explica la ausencia de UFC en el bazo tal como lo define (Téllez Dorado J.R.2019) así como la estimulación al fenotipo M1 proinflamatorio que detectamos en este trabajo sobre los macrófagos de bazo provenientes de ratones infectados con *Nocardia brasiliensis* lo cual podría ser producto de la acumulación de antígenos bacterianos en este órgano linfoide secundario. Al acumularse el antígeno en el bazo, se activa su presentación y la respuesta inmune adaptativa que evita que llegue a otros sitios a nivel sistémico y por consecuencia evita la estimulación de los macrófagos peritoneales ya que nunca estuvieron en contacto con los antígenos de *Nocardia brasiliensis*. Esto demuestra el papel fundamental de los órganos linfoides secundarios, los cuales no solamente funcionan como campamentos inmunológicos en donde se estimulan y se generan células para el combate y protección del individuo si no como compartimentos clave que evitan la diseminación de patógenos, antígenos o sus metabolitos que desencadenen una respuesta sistémica exacerbada. El sistema inmune a pesar de ser un sistema intercomunicado genera respuestas compartimentalizadas asegurando su correcto funcionamiento.

CAPITULO 8

CONCLUSIÓN:

No se observó expresión de genes M1/M2 en macrófagos peritoneales de ratones con actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*. Se descarta la hipótesis planteada.

REFERENCIAS:

1. Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, Levy RA, Cervera R, editors. Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]. Bogota (Colombia): El Rosario University Press; 2013 Jul 18. PMID: 29087650.
2. Ahmed I, Ismail N. M1 and M2 Macrophages Polarization via mTORC1 Influences Innate Immunity and Outcome of Ehrlichia Infection. *J Cell Immunol.* 2020; 2(3): 108-115.
3. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci.* 2018 Jun 19;19(6):1801. doi: 10.3390/ijms19061801. PMID: 29921749; PMCID: PMC6032107
4. AVMA. AVMA guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. Available at: https://www.avma.org/sites/default/files/2020-01/2020_Euthanasia_Final_1-15-20.pdf
5. Bonifaz A, Tirado-Sánchez A, Calderón L, Saúl A, Araiza J, Hernández M, González GM, Ponce RM. Mycetoma: experience of 482 cases in a single center in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Aug 21;8(8):e3102. doi: 10.1371/journal.pntd.0003102.
6. Carrillo, J., & Vázquez-Marmolejo, A. V. (2020). Inducible nitric oxide synthase blockade with aminoguanidine, protects mice infected with *Nocardia brasiliensis* from actinomycetoma development. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008775>.
7. Cassado Ados A, de Albuquerque JA, Sardinha LR, Buzzo Cde L, Faustino L, Nascimento R, Ghosn EE, Lima MR, Alvarez JM, Bortoluci KR (2011) Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli. *PLoS One* 6(7): e22141. doi:10.1371/journal.pone.0022141
8. Cassado Ados A, D'Império Lima MR, Bortoluci KR. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Front*

Immunol. 2015 May 19;6:225. doi: 10.3389/fimmu.2015.00225. PMID: 26042120; PMCID: PMC4437037.

9. Chaplin DD. The immune system. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:S442-59
10. Cohn Za, Benson B. The Differentiation of mononuclear phagocytes. morphology, cytochemistry, and biochemistry. *J Exp Med*. 1965 Jan 1;121(1):153-70. doi: 10.1084/jem.121.1.153.
11. Cohen CA, et al. Intra-abdominal fat depots represent distinct immunomodulatory microenvironments: a murine model. *PLoS One*. 2013; 8(6):e66477. [PubMed: 23776677]
12. Elks, P. M., Brizee, S., van der Vaart, M., Walmsley, S. R., van Eeden, F. J., Renshaw, S. A., & Meijer, A. H. (2013). Hypoxia Inducible Factor Signaling Modulates Susceptibility to Mycobacterial Infection via a Nitric Oxide Dependent Mechanism. *PLoS Pathogens*, 9(12), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003789>
13. Goodfellow M, Maldonado LA. 2012. Genus *Nocardia* Trevisan 1889, p 376 – 419. In Goodfellow M, Kampfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki K, Ludwig W, Whitman W (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed, vol 5. Springer, New York, NY.
14. Gordon S, Lawson L, Rabinowitz S, Crocker PR, Morris L, Perry VH (1992) Antigen markers of macrophage differentiation in murine tissues. *Curr Top Microbiol Immunol* 181:1-37
15. Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, Bortoluci KR, Almeida SR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 9;107(6):2568-73. doi: 10.1073/pnas.0915000107. Epub 2010 Jan 25. PMID: 20133793; PMCID: PMC2823920.
16. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216

17. Jayakumar P, Laganson A, Deng M. GATA6⁺ Peritoneal Resident Macrophage: The Immune Custodian in the Peritoneal Cavity. *Front Pharmacol.* 2022 Mar 23;13:866993. doi: 10.3389/fphar.2022.866993. PMID: 35401237; PMCID: PMC8984154.
18. Kawai S, Takagi Y, Kaneko S, Kurosawa T. Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp Anim.* 2011;60(5):481-7. doi: 10.1538/expanim.60.481. PMID: 22041285.
19. Knight, M., & Stanley, S. (2019). HIF-1 α as a central mediator of cellular resistance to intracellular pathogens. *Current Opinion in Immunology*, 60. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.05.005>
20. Kloc, M. (2017). *Results and Problems in Cell Differentiation: Macrophages-Origin, Functions and Biointervention.* (1st ed.) Springer International Publishing. <https://doi.org/https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-319-54090-0>
21. Kohno, K., Koya-Miyata, S., Harashima, A. et al. Inflammatory M1-like macrophages polarized by NK-4 undergo enhanced phenotypic switching to an anti-inflammatory M2-like phenotype upon co-culture with apoptotic cells. *J Inflamm* 18, 2 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12950-020-00267-z>
22. Kuchipudi, Suresh V et al. "18S rRNA is a reliable normalisation gene for real time PCR based on influenza virus infected cells." *Virology journal* vol. 9 230. 8 Oct. 2012, doi:10.1186/1743-422X-9-230
23. Lee, M., Rey, K., Besler, K., Wang, C., & Choy, J. (2017). *Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase* (pp. 181–207). https://doi.org/10.1007/978-3-319-54090-0_8
24. Lee, S.J. Mannose Receptor-Mediated Regulation of Serum Glycoprotein Homeostasis. *Science* 2002, 295, 1898–1901.
25. Leteux, C.; Chai, W.; Loveless, R.W.; Yuen, C.T.; Uhlin-Hansen, L.; Combarrous, Y.; Jankovic, M.; Maric, S.C.; Misulovin, Z.; Nussenzweig, M.C.; et al. The cysteine-rich domain of the macrophage mannose receptor is a multispecific lectin that recognizes chondroitin sulfates A and B and

sulfated oligosaccharides of blood group Lewis(a) and Lewis(x) types in addition to the sulfated N-glycans of lutropin. *J. Exp. Med.* 2000, 191, 1117–1126.

26. Livak, K.J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>
27. Lopez Martinez R, Mendez Tovar LJ, Lavallo P, Welsh O, Saul A, Macotela Ruiz E. Epidemiology of mycetoma in Mexico: study of 2105 cases. *Gac Med Mex* 1992;128:477 - 81
28. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Bonifaz A, Arenas R, Mayorga J, Welsh O, Vera-Cabrera L, Padilla-Desgarenes MC, Contreras Pérez C, Chávez G, Estrada R, Hernández-Hernández F, Manzano-Gayosso P. Update on the epidemiology of mycetoma in Mexico. A review of 3933 cases. *Gac Med Mex.* 2013 Sep-Oct;149(5):586-92.
29. Olson, N., & Van Der Vliet, A. (2011). Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 25(2), 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2010.12.010>
30. Okabe, Y., and Medzhitov, R. (2014). Tissue-specific Signals Control Reversible Program of Localization and Functional Polarization of Macrophages. *Cell* 157 (4), 832–844. doi:10.1016/j.cell.2014.04.016
31. Palazon, A., Goldrath, A. W., Nizet, V., & Johnson, R. S. (2014). HIF Transcription Factors, Inflammation, and Immunity. In *Immunity* (Vol. 41, Issue 4, pp. 518–528). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.09.008>
32. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010;20(2):87-103. doi:10.1615/critreveukargeneexpr.v20.i2.10. PMID: 21133840; PMCID: PMC3066460.
33. Pawelczak M, Rosenthal J, Milla S, Liu YH, Shah B. Evaluation of the pro-

inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α in adolescents with polycystic ovary syndrome. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2014 Dec;27(6):356-9. doi: 10.1016/j.jpag.2014.01.104.

34. Peyssonnaud, C., Datta, V., Cramer, T., Doedens, A., Theodorakis, E. A., Gallo, R. L., Hurtado-Ziola, N., Nizet, V., & Johnson, R. S. (2005). HIF-1 α expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 115(7), 1806–1815. <https://doi.org/10.1172/JCI23865>
35. Phelan, J. J., Basdeo, S. A., Tazoll, S. C., McGivern, S., Saborido, J. R., & Keane, J. (2018). Modulating iron for metabolic support of TB host defense. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue OCT). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02296>
36. Poh, X.Y., Hong, J.M., Bai, C. *et al.* *Nos2*^{-/-} mice infected with *M. tuberculosis* develop neurobehavioral changes and immunopathology mimicking human central nervous system tuberculosis. *J Neuroinflammation* 19, 21 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02387-0>
37. Rath M, Müller I, Kropf P, Closs E, & Munder M. (2014). Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>
38. Rios FJ, Touyz RM, Montezano AC. Isolation and Differentiation of Murine Macrophages. *Methods Mol Biol.* 2017; 1527:297-309. doi: 10.1007/978-1-4939-6625-7_23. PMID: 28116725.
39. Salinas-Carmona MC, Torres-Lopez E, Ramos AI, Licon-Trillo A, Gonzalez-Spencer D. Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect Immun.* 1999 May;67(5):2428-32. doi: 10.1128/IAI.67.5.2428-2432.1999. PMID: 10225905; PMCID: PMC115988.
40. Salinas-Carmona MC. *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. *Microbes Infect.* 2000 Sep;2(11):1373-81. doi: 10.1016/s1286-4579(00)01291-0. PMID: 11018454.

41. Taylor, P.R.; Gordon, S.; Martinez-Pomares, L. The mannose receptor: Linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol.* 2005, 26, 104-110.
42. Tellez Dorado J.R. 2019. Cuantificación de las subpoblaciones de Linfocitos T CD4+ Y CD8+ en un modelo experimental de actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León. <http://eprints.uanl.mx/19800/1/1080314363.pdf>
43. Titheradge, M. A. (Ed) (1998) Nitric Oxide Protocols, Humana, NJ.
44. Treviño Villarreal H. 2009. El papel de los lípidos de superficie de *Nocardia brasiliensis* en el establecimiento del actinomicetoma experimental. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León <http://eprints.uanl.mx/2056/1/1080186690.pdf>
45. Trevino-Villarreal, J. H., Vera-Cabrera, L., Valero-Guillén, P. L., & Salinas-Carmona, M. C. (2012). *Nocardia brasiliensis* Cell Wall Lipids Modulate Macrophage and Dendritic Responses That Favor Development of Experimental Actinomycetoma in BALB/c Mice. *Infection and Immunity*, 80(10). <https://doi.org/10.1128/IAI.00446-12>.
46. Turchyn LR, Baginski TJ, Renkiewicz RR, Lesch CA, Mobley JL. Phenotypic and functional analysis of murine resident and induced peritoneal macrophages. *Comp Med.* 2007 Dec;57(6):574-80. PMID: 18246870.
47. Xue Q, Yan Y, Zhang R, Xiong H. Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12):3805. Published 2018 Nov 29. doi:10.3390/ijms19123805
48. Yakovlev, V.A.; Barani, I.J.; Rabender, C.S.; Black, S.M.; Leach, J.K.; Graves, P.R.; Kellogg, G.E.; Mikkelsen, R.B. Tyrosine nitration of Ikappa Balpha: A novel mechanism for NF-kappaB activation. *Biochemistry* 2007, 46, 11671–11683.
49. Yang CS, Yuk JM, Jo EK. The role of nitric oxide in mycobacterial infections. *Immune Netw.* 2009 Apr;9(2):46-52. doi: 10.4110/in.2009.9.2.46. Epub 2009 Apr 30. PMID: 20107543; PMCID: PMC2803309.

50. Yarilina A, Park-Min KH, Antoniv T, Hu X, Ivashkiv LB. TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon-response genes. *Nat Immunol*. 2008 Apr; 9(4):378–387.
51. Wang Y, Cui X, Tai G, Ge J, Li N, Chen F, Yu F, Liu Z. A critical role of activin A in maturation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo. *Cell Mol Immunol* 2009, 6:387–392.
52. Welsh, O., Vera, C. L. & Salinas, M. C. (2007). Mycetoma. *Clinics in Dermatology*, 25, 195 – 202.
53. Welsh O, Vera-Cabrera L, Welsh E, Salinas MC. Actinomycetoma and advances in its treatment. *Clin Dermatol*. 2012 Jul-Aug;30(4):372-81. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.06.027. PMID: 22682184.