

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DEL PAPEL DE LAS CÉLULAS CEBADAS EN LA
PATOGENIA DEL ACTINOMICETOMA POR *Nocardia brasiliensis*
EN UN MODELO EXPERIMENTAL**

Por:

TOMÁS ALEJANDRO SUÁREZ VÁZQUEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGÍA**

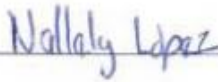
**EVALUACIÓN DEL PAPEL DE LAS CÉLULAS CEBADAS EN LA
PATOGENIA DEL ACTINOMICETOMA POR *Nocardia brasiliensis* EN
UN MODELO EXPERIMENTAL**

Aprobación de Tesis.



Dr. C. Mario César Salinas Carmona

Director



Dra. C. Nallely López López

Co-director



Dr. C. Manuel Mejía Torres

Miembro de la comisión



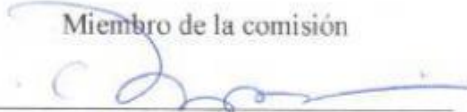
Dr. C. Noe Macias Segura

Miembro de la comisión



Dra. C. Raquel Garza Guajardo

Miembro de la comisión



Dr med. Felipe Arturo Morales Martinez

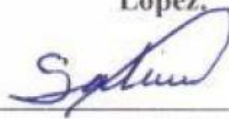
Subdirector de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DEL PAPEL DE LAS CÉLULAS CEBADAS EN LA PATOGENIA DEL ACTINOMICETOMA POR *Nocardia brasiliensis* EN UN MODELO EXPERIMENTAL

Presentado por: M.C. Tomás Alejandro Suárez Vázquez

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

López,



Dr. C. Mario César Salinas Carmona

Director



Dra. C. Nallely López López

Co-director



Dr. C. Noe Macías Segura

Miembro de la comisión



Dr. C. Manuel Mejía Torres

Miembro de la comisión



Dra. C. Raquel Garza Guajardo

Miembro de la comisión

**Autorizado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de
Medicina y Hospital Universitario "José Eleuterio González" con
número de registro: IN23-0001**

ÍNDICE GENERAL

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Micetoma	1
1.2 Etiología	2
1.3 Geografía y epidemiología.....	3
1.4 Género <i>Nocardia</i>	5
1.5 <i>Nocardia brasiliensis</i>	5
1.6 Modelo experimental de actinomicetoma	6
1.7 Evolución Clínica del actinomicetoma	7
1.8 El papel de la inmunidad innata y adquirida en modelos experimentales: nocardiosis/micetoma en modelo murino.....	8
1.9 Antecedentes sobre la respuesta inmune contra <i>Nocardia brasiliensis</i>	8
1.10 Células cebadas y su papel en el control de infecciones.....	10
1.11 Características biológicas y fenotípicas de las células cebadas.....	10
1.12 Clasificación de las células cebadas en humanos y ratón	12
1.13 Activación clásica: mecanismo de desgranulación	13
1.14 Desgranulación y mediadores preformados	14
1.15 Activación no clásica: Mecanismos independientes de IgE.....	15
1.16 Síntesis <i>de novo</i> de mediadores.....	15
1.17 Citocinas y quimiocinas.....	16
1.18 Eicosanoides	16
1.19 Factor activador de plaquetas.....	16
1.20 Más allá de la alergia: el papel antimicrobiano de las células cebadas.....	16
2. ANTECEDENTES	18
2.1 Ausencia de información para nocardiosis	18
2.2 Reconocimiento de patógenos y mecanismos efectores antimicrobianos	18
2.3 Células cebadas en la transición a la persistencia bacteriana.....	20
2.4 Células cebadas en el control de infecciones crónicas por bacterias intracelulares: el caso de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
2.5 El modelo murino Kit ^{W-sh/W-sh} (Wsh) para el estudio de la función antimicrobiana de las células cebadas.....	22
2.6 Limitaciones y ventajas del modelo Wsh	22

3. JUSTIFICACIÓN	24
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS	25
4.1 Pregunta de Investigación	25
4.2 Hipótesis	25
5. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo General	26
5.2 Objetivos específicos:	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1 Diseño experimental	27
6.2 Modelo de infección de <i>Nocardia brasiliensis</i> Evolución clínica del desarrollo del micetoma	27
6.3 Microbiología: Preparación del inóculo de <i>Nocardia brasiliensis</i>	28
6.4 Unidades Formadoras de Colonias (UFC)	28
6.5 Obtención de material biológico	29
6.6 Cortes histológicos	30
6.7 Histoquímica: Tinción de Hematoxilina y Eosina	30
6.8 Tinción de Azul de toluidina	31
6.9 Análisis histopatológico	32
6.10 Análisis Azul de toluidina	32
6.11 Obtención de células (Citometría de flujo)	32
6.12 Análisis por citometría de flujo	33
6.13 Tamaño, peso y celularidad de Bazo	34
6.14 Cuantificación de anticuerpos IgG anti <i>Nocardia brasiliensis</i> por ELISA	34
6.15 Cultivo de células cebadas y ensayos de viabilidad	34
6.16 Ensayo de degranulación	35
6.17 Cuantificación de citocinas inflamatorias mediante ELISA	36
6.18 Análisis estadístico	36
7. RESULTADOS	37
7.1 Las células cebadas son esenciales para la contención de <i>Nocardia brasiliensis</i> en actinomicetoma experimental.	37
7.2 Los granos bacterianos dentro del actinomicetoma presentaron diferencias estructurales en ratones Kit ^{W-sh/W-sh} en comparación con los ratones control.	40
7.3 El micetoma experimental en ratones Kit ^{W-sh/W-sh} mostró una menor infiltración leucocitaria, acompañada de un mayor tamaño esplénico en comparación con los ratones control.	45

7.4 Activación inflamatoria de células cebadas derivados de médula ósea (BMMC) tras la infección <i>in vitro</i> con <i>Nocardia brasiliensis</i>	46
8. DISCUSIÓN	48
9. CONCLUSIÓN	54
10. REFERENCIAS:.....	55

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Criterios taxonómicos para la adscripción bacteriana al género <i>Nocardia</i>	5
Tabla 2 Filogenia de <i>Nocardia brasiliensis</i>	6
Tabla 3 Antecedentes sobre la respuesta inmune contra <i>Nocardia brasiliensis</i>	8
Tabla 4 Clasificación de células cebadas en humanos y modelo murino.....	13
Tabla 5 Comparación de modelos murinos deficientes de células cebadas.	23
Tabla 6 Distribución de ratones por grupos de trabajo.....	27
Tabla 7 Análisis histopatológico y celular comparativo en lesiones de actinomicetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i> en ratones WT y Kit ^{W-sh/W-sh}	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1: Principales actividades laborales en 3,123 casos de actinomicetoma registrados en México en el 2012	4
Figura. 2 Casos registrados de micetoma en México en el 2012 <i>por entidad federativa</i>.....	4
Figura. 3 Esquema para obtención de material biológico.....	30
Figura. 4 Funcionalidad del modelo Kit ^{W-sh/W-sh} ..	38
Figura. 5 Distribución de células cebadas en actinomicetoma al día 72 posterior a infección..	38
Figura. 6 Evolución clínica de la infección por <i>Nocardia brasiliensis</i>	39
Figura. 7 Falla en el control de la carga bacteriana.	40
Figura. 8 Morfometría de los gránulos de <i>Nocardia brasiliensis</i>.....	41
Figura. 9 Infiltración leucocitaria en actinomicetoma al día 72 posterior a infección.	46
Figura. 10 Síntesis de mediadores proinflamatorios en células cebadas derivadas de médula ósea (BMMC) por infección in vitro con <i>Nocardia brasiliensis</i>.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
CCL-2	Quimioquina ligando 2 (MCP-1)
μL	Microlitro (unidad de volumen)
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)
C3aR	Receptor de C3a (anafilatoxina del complemento)
C5aR	Receptor de C5a (anafilatoxina del complemento)
CCL3	Quimioquina ligando 3 (MIP-1α)
CCR-2	Receptor de quimioquinas tipo 2
CD117	Receptor c-Kit (marcador de célula cebada y células madre)
CD34+	Células que expresan CD34 (marcador de células madre hematopoyéticas)
CD4	Co-receptor de linfocitos T helper
c-Kit	Receptor tirosina cinasa para SCF (CD117)
CPA3	Carboxipeptidasa A3
CTMC	Célula cebada de tejido conectivo (murino)
CXCR2	Receptor de quimioquinas CXC tipo 2
DAG	Diacilglicerol (segundo mensajero)
DAMPS	Patrones moleculares asociados a daño
FcαR	Receptor Fc para IgA (CD89)
FcγR	Receptor Fc para IgG
FcεRI	Receptor Fc de alta afinidad para IgE
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
H1, H2, H3, H4	Receptores de histamina
HUJEG-1	Hospital Universitario José Eleuterio Gonzalez
IgA	Inmunoglobulina A

IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-10	Interleucina 10
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IP3	Inositol trifosfato (segundo mensajero)
ITAM	Motivo de activación inmune basado en tirosina
LAT	Enlazador para activación de células T
LL-37	Péptido antimicrobiano catelicidina humano
MCps	Precursores de células cebadas
MCT	Células cebadas triptasa (+) (mucosa)
MCTC	Células cebadas triptasa y quimasa (+) (tejido conectivo)
mm	Milímetro
MMC	Células cebadas de mucosa
MMP	Metaloproteasa de matriz
Mrgprb2	Receptor acoplado a proteína G en células cebadas murinas
Mrgprx2	Receptor acoplado a proteína G en células cebadas humanas
NTAL	Enlace de activación de células no T
P24	Proteína de 24 kDa <i>Nocardia brasiliensis</i>
P61	Proteína de 61 kDa <i>Nocardia brasiliensis</i>
PAF	Factor activador de plaquetas
PI3K	Fosfoinositido 3-cinasa
PKC	Proteína cinasa C
PLA2	Fosfolipasa A2

PLC	Fosfolipasa C
SCF	Factor de células madre (c-Kit ligand)
scRNA-seq	Secuenciación de ARN de células individuales
Syk	Esplenotirosina cinasa
TBP	Tuberculosis pulmonar
Th2	Linfocitos T colaboradores tipo 2
TLR	Receptor tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocitos T reguladores
UFC	Unidades formadoras de colonias
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular 1
$\alpha 4\beta 7$	Integrina alfa4-beta7
μm	Micrómetro

RESUMEN

M.C. Tomás Alejandro Suárez Vázquez Fecha de titulación: julio del 2026

Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Medicina

Título del trabajo: EVALUACIÓN DEL PAPEL DE LAS CÉLULAS CEBADAS EN LA PATOGENIA DEL ACTINOMICETOMA POR *Nocardia brasiliensis* EN UN MODELO EXPERIMENTAL

Candidato al Grado de Doctorado en Ciencias con Orientación en Inmunología

Área de Estudio: Inmunología Número de páginas: 66

Resumen: *Nocardia brasiliensis* es el principal agente etiológico del actinomicetoma, una infección subcutánea crónica. Si bien estudios en modelos murinos han caracterizado una respuesta robusta de anticuerpos sistémicos junto con un microambiente local inmunosupresor, se desconoce el papel de una de las células inmunes innatas residentes en los tejidos particularmente las células cebadas, en esta infección. Este estudio tuvo como objetivo definir la participación de las células cebadas en la patogénesis del actinomicetoma experimental.

Objetivo: Evaluar la participación de las células cebadas en el establecimiento y evolución del actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* en un modelo experimental.

Material y Métodos: *In vivo*, se empleó un modelo de actinomicetoma en ratones WT y deficientes en células cebadas (C57BL/6- Kit^{W-sh/W-sh}). Se monitoreó la progresión de la lesión, carga bacteriana (UFC), distribución de células cebadas (tinción con azul de toluidina) e histopatología de granulomas (H&E). La infiltración de células inmunitarias (Ly6G/6C+, CD3+ por citometría de flujo), respuesta esplénica y niveles de IgG anti-*Nocardia* (ELISA) se analizaron a los 30 y 72 días postinfección (DPI). *In vitro*, se evaluó la respuesta de células cebadas derivadas de médula ósea (BMMC) a la infección por *Nocardia brasiliensis*, evaluando viabilidad (citometría de flujo), activación por ensayo de degranulación (beta-hexosaminidasa) y secreción de citocinas (ELISA).

Resultados y conclusión: *In vivo*, las células cebadas son esenciales para el control bacteriano, la formación de granulomas organizados y el reclutamiento secuencial de células mieloides (Ly6G/6C+) y linfocitos T CD3+. Los ratones deficientes en células cebadas (Wsh) presentan carga bacteriana elevada e incapacidad para formar granulomas organizados, adoptando una morfología irregular con múltiples focos bacterianos, a pesar de desarrollar una respuesta humoral (IgG) normal. Se concluye que las células cebadas son reguladores clave de la respuesta inmune efectiva contra *Nocardia brasiliensis*. *In vitro*, *Nocardia brasiliensis* activa y polariza células de médula ósea, induciendo la secreción de IL-6, TNF- α y TGF



Dr. C. Mario Cesar Salinas Carmona

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Micetoma

El micetoma es una patología granulomatosa, infecciosa y crónica, Clínicamente, esta afección se manifiesta como una inflamación de los tejidos blandos con aspecto tumoral, que evoluciona formando un tracto sinusal o fístula a través del cual se drena material purulento que contiene los gránulos característicos del agente etiológico [1]. Hoy en día se conoce la etiología de la enfermedad y sus agentes infecciosos, sin embargo, al igual que otras enfermedades requirió del estudio de diversos médicos e investigadores quienes contribuyeron a esclarecer la naturaleza de esta patología. La historia del micetoma se remonta a 1842, cuando el cirujano inglés John McGill documentó brevemente sus observaciones sobre esta afección en la región de Madura, India [2]. Cuatro años después, en 1846, Godfrey reportó en la misma zona cuatro casos de una nueva entidad clínica, a la que denominó "*morbus tuberculosis pedis*". Ese mismo año, Colebrook introdujo el término "pie de Madura". Posteriormente, en 1860, Carter H.V. propuso el nombre "micetoma" y, además, identificó la presencia de granos, los cuales describió como partículas de origen fúngico. En 1874, Ch. McQuestin reportó la presencia de micetomas en el continente americano, específicamente en Sonora, México [2]. Después, N. F. Surveyor y R. Boyce observaron que además de los hongos, los actinomicetos también eran responsables de esta infección. En México, los primeros estudios sobre micetomas fueron realizados por Ricardo Cicero en 1911. M. Langeron empleó el término para referirse a casos ocasionados tanto por *Actinomyces* como por *Nocardia* en 1928. Finalmente, en 1913, Pinoy describió los micetomas de origen actinomicótico y estableció una clasificación que distingue entre eumicetoma, cuando el agente causal es un hongo, y actinomicetoma, cuando se trata de una bacteria [2].

El micetoma constituye, en gran medida de los casos, una infección adquirida por vía traumática, mediante la cual microorganismos presentes en el suelo logran introducirse en el tejido subcutáneo. Dicha entidad clínica cursa con un proceso inflamatorio crónico que genera deformidad estructural en el tejido afectado, focalizándose con mayor frecuencia en los miembros inferiores. Esta patología ha sido clasificada dentro del grupo de

enfermedades tropicales desatendidas [3]. En la actualidad, los esquemas terapéuticos disponibles implican costos elevados y periodos de tratamiento que se extienden desde varios meses hasta años; asimismo, la intervención quirúrgica, incluida la amputación del miembro afectado, constituye un desenlace frecuente [3,4].

Desde una perspectiva teórica, las enfermedades infecciosas de etiología bacteriana o fúngica podrían ser prevenibles mediante estrategias de inmunización activa; no obstante, actualmente no se dispone de una vacuna para esta ni para numerosas infecciones de características similares [5].

Desde una mirada histopatológica, tanto en el hospedero humano como en modelos experimentales murinos, el tejido afectado evidencia un proceso inflamatorio de carácter mixto agudo y crónico, caracterizado por la presencia de múltiples microabscesos, formación de granulomas, acumulación de células espumosas, infiltrado de macrófagos y linfocitos, así como fibrosis periférica dispuesta alrededor de las microcolonias bacterianas [6].

En cuanto a los factores que condicionan el establecimiento de la infección, se han identificado tres elementos fundamentales: la magnitud de la carga bacteriana, el estado inmunológico del huésped y la función hormonal. Asimismo, la actividad ocupacional del huésped representa un factor determinante en la presentación clínica, dado que esta entidad se observa con mayor prevalencia en individuos que desarrollan sus labores en condiciones rudimentarias, sin protección adecuada ni calzado, particularmente en entornos rurales o al aire libre [7].

1.2 Etiología

La clasificación del micetoma se establece en función del agente etiológico implicado en el proceso infeccioso. Así, se distingue entre actinomicetoma, cuando el agente causal corresponde a actinomicetos filamentosos aeróbicos, y eumicetoma, cuando la infección es ocasionada por hongos verdaderos [8]. En el contexto epidemiológico de México, el actinomicetoma constituye la forma predominante, representando aproximadamente el 96.52 % del total de casos registrados. Dentro de este grupo, *Nocardia brasiliensis* se identifica como el agente etiológico más frecuente, presente en el 65.58 % de las infecciones [9]. La distribución de las especies bacterianas involucradas presenta una

marcada variabilidad geográfica. *Actinomadura pelletieri* se asocia predominantemente con regiones de alta pluviosidad, mientras que *Nocardia brasiliensis* y *Streptomyces somaliensis* muestran una mayor prevalencia en zonas áridas y desérticas [10]. Por su parte, el eumicetoma presenta una proporción considerablemente menor en México, con apenas el 3.48 % de los casos. Esta variante es ocasionada por un amplio espectro de hongos, entre los que se incluyen los géneros *Fusarium*, *Madurella*, *Leptosphaeria* y *Acremonium* [9].

1.3 Geografía y epidemiología

El actinomicetoma se considera una patología de carácter laboral, con predominio en jornaleros del ámbito rural cuyas edades oscilan entre los 20 y 45 años, y residen en zonas tropicales del planeta. Dichas regiones geográficas se localizan en latitudes 15° S y 30° N, y los países que reportan las tasas más elevadas de esta entidad clínica son Mauritania, Sudán, Yemen, Pakistán, India, Senegal y Somalia [8].

En el continente americano, la mayor incidencia del micetoma se concentra en Venezuela y México; no obstante, la enfermedad puede identificarse en la mayoría de los países de Centroamérica y Sudamérica [11]. En México, hasta el año 2012, se habían documentado 3,933 casos en un periodo de 54 años. La distribución por sexo muestra una prevalencia del 75.6 % en hombres y del 24.4 % en mujeres. En cuanto al grupo etario, el 75.72 % de los casos registrados corresponde a adultos comprendidos entre los 16 y 50 años. Respecto a la actividad ocupacional, el estrato predominante es el de campesinos, con un 58.41 %, después por amas de casa, con un 21.79 % (Figura 1). Las entidades federativas con mayor frecuencia son Morelos, Jalisco, Guerrero, Nuevo León, Michoacán, Veracruz (Figura 2). En relación con la clasificación etiológica, el actinomicetoma representa el 96.52 % de casos, con *Nocardia brasiliensis* como el agente causal más frecuente, con un 65.58 % del total de infecciones.

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: Principales actividades laborales en 3,123 casos de actinomicetoma registrados en México en el 2012 [9].

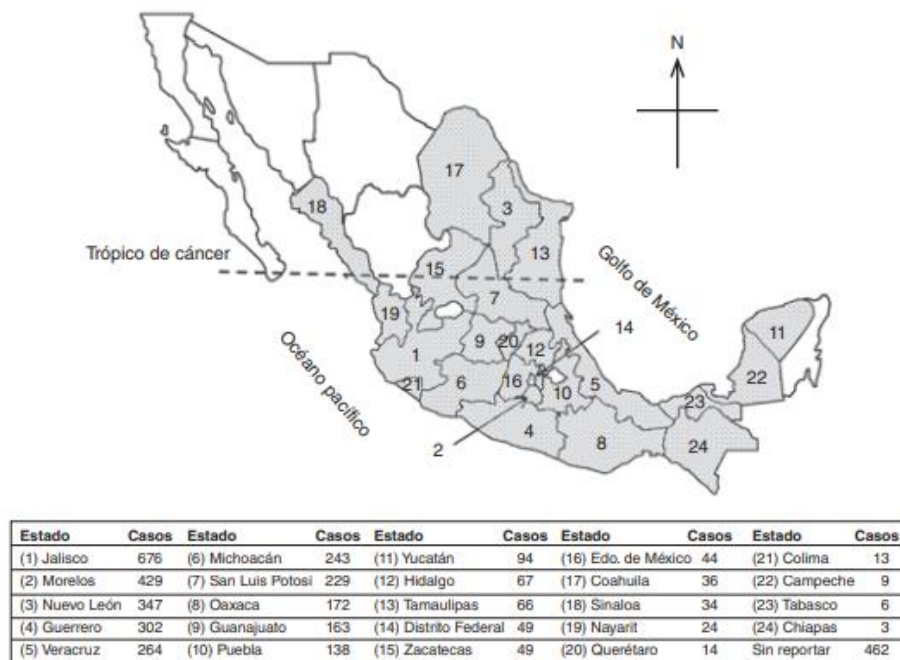


Figura. 2 Casos registrados de micetoma en México en el 2012 por entidad federativa [9].

1.4 Género *Nocardia*

La clasificación taxonómica del género *Nocardia* ha sido históricamente objeto de controversia y revisión constante. El origen de su denominación se remonta a 1888, cuando Edmond Nocard identificó un microorganismo con tinción Gram positiva a partir de un caso de farcia bovina, donde inicialmente se le registró como el agente causal de dicha afección. Trevisan, en 1889, asignó a esta cepa el nombre *Nocardia farcinica*, estableciendo con ello la base nomenclatura del género (Tabla 1) [12].

En ese mismo año, se reportó el primer caso de infección humana por Eppinger, ocasionado por una especie de este género, documentando un absceso cerebral en un paciente y designando al microorganismo responsable como *Cladothrix asteroides* por Eppinger H., en 1890. Posteriormente, en 1896, Blanchard clasificó este taxón bajo la denominación *Nocardia asteroides* [2].

Tabla 1 Criterios taxonómicos para la adscripción bacteriana al género *Nocardia*.

Característica	Referencia
Presencia de ácidos grasos de cadena ramificada. Longitud entre 46 y 60 átomos de carbono.	[13]
Pared celular constituida por arabinosa, galactosa, alanina, ácido glutámico y ácido DL-diaminopimélico.	[14]
Detección de ácido tuberculosteárico en conjunto con ácidos grasos insaturados.	[15]
Existencia de menaquinonas, las cuales participan en la cadena de transporte electrónico.	[16]
Composición lipídica caracterizada por la presencia de 3,3-trealosa dimicolato, difosfatidilglicerol, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina.	[6]

1.5 *Nocardia brasiliensis*

La bacteria *Nocardia brasiliensis* es un actinomiceto aerobio saprófito, inmóvil e intracelular. Se caracteriza por ser un bacilo aerobio estricto, con tinción Gram positiva y débilmente ácido-alcohol resistente en las tinciones de Ziehl-Neelsen o Kinyoun, propiedad atribuida a la capa externa de ácidos micólicos, cuya presencia inhibe la liberación del colorante; en consecuencia, la pérdida de estos lípidos conlleva la pérdida de la tinción. Morfológicamente, presenta un crecimiento en hifas fragmentadas en

bastones cuyas dimensiones oscilan entre 0.5 y 1.2 μm [20]. Estas características en conjunto con los criterios quimiotaxonómicos previamente establecidos para el género *Nocardia*, constituyen las bases fundamentales para la identificación certera de este patógeno [12]. El análisis de la pared de *Nocardia brasiliensis* reveló características compatibles con bacterias Gram positivas, lo que condujo a su adscripción al filo Actinobacteria. Este taxón representa uno de los grupos más diversos y numerosos dentro del dominio Bacteriano, y se distingue por una concentración elevada de guanina y citosina (G+C) en el genoma, así como por una notable variedad morfológica que abarca desde formas cocoides hasta estructuras filamentosas fragmentables. Las especies pertenecientes a este filo han desarrollado estrategias ecológicas diversas, tales como *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium*. Un rasgo molecular singular que constituye una sinapomorfía del filo Actinobacteria es la presencia de una secuencia insertada de aproximadamente 100 pares de bases, localizada entre las hélices 54 y 55 del gen que codifica el ARN ribosómico 23S (Tabla 2) [21,22].

Tabla 2 Filogenia de *Nocardia brasiliensis*.

Taxón	Categoría
Dominio	<i>Bacteria</i>
Filo	<i>Actinomycetota</i>
Clase	<i>Actinomycetes</i>
Orden	<i>Mycobacteriales</i>
Suborden	<i>Corynebacterineae</i>
Familia	<i>Nocardiaceae</i>
Género	<i>Nocardia</i>
Especie	<i>brasiliensis</i>

1.6 Modelo experimental de actinomicetoma

El modelo murino experimental de actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* constituye una herramienta reproducible que reproduce fielmente las características clínicas e histopatológicas observadas en la infección humana, permitiendo el estudio de la patogenia, la respuesta inmune, la evaluación de factores de virulencia y el ensayo de estrategias terapéuticas y profilácticas [23,24]. Para su establecimiento, se emplea la cepa *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 (ATCC 700358), identificada originalmente de un

paciente con micetoma, la cual se cultiva en caldo infusión cerebro-corazón hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, momento en el cual se prepara una suspensión unicelular de 10^7 unidades formadoras de colonias por ml (UFC/mL) [23]. Se utilizan ratones BALB/c de ambos sexos, de 9 a 12 semanas de edad, mantenidos en condiciones estándar de bioterio, y se inyectan 100 μ L de la suspensión bacteriana en el cojinete plantar en el miembro posterior sin adyuvante, dosis que resulta óptima para el desarrollo del micetoma, mientras que dosis inferiores (10^3 o 10^5 UFC) no logran inducir la lesión característica [23].

1.7 Evolución Clínica del actinomicetoma

La evolución clínica sigue una secuencia predecible: a las 72 horas se observa inflamación leve con edema de 7 mm, entre los días 7 y 14 se acentúa el edema con hiperemia y pequeños abscesos, al día 28 se establece un cuadro de edema, abscesos, fístulas con descarga de gránulos, y al día 90 se alcanza un micetoma plenamente desarrollado con edema de hasta 19 mm, abscesos abiertos, fístulas y cicatrices; aproximadamente el 80% de los animales desarrollan un micetoma típico y cerca del 60% curan espontáneamente después de 150 días, pudiendo observarse destrucción ósea en la fase crónica [23]. Histopatológicamente, durante los primeros 7 días se observan múltiples microabscesos con abundantes granulocitos polimorfonucleares y límites pobremente definidos; al día 10 aparecen macrófagos periféricos en la lesión, algunos con aspecto espumoso característico; al día 30 se evidencian abscesos múltiples bien delimitados por macrófagos de tipo espumoso con microcolonias de *Nocardia brasiliensis*; y entre los días 90 y 150 persisten microcolonias rodeadas por infiltrado inflamatorio mixto (polimorfonucleares, macrófagos, linfocitos) y fibrosis periférica, siendo la tinción de Kinyoun útil para visualizar bacilos ácido-alcohol resistentes en agregados y formaciones filamentosas [23].

1.8 El papel de la inmunidad innata y adquirida en modelos experimentales: nocardiosis/micetoma en modelo murino

La respuesta del hospedero frente por *Nocardia brasiliensis* se inicia de forma temprana después de la inoculación bacteriana, caracterizada por un infiltrado inflamatorio local compuesto predominantemente por células polimorfonucleares. Clínicamente, se manifiesta como tumefacción macroscópica en el sitio de inoculación, la cual evoluciona de manera progresiva y paulatina en ausencia de fiebre o dolor [6]. Tras varios meses de inflamación crónica y crecimiento lesional continuo, algunos nódulos fistulizan espontáneamente a través de la piel, con drenaje de exudado seroso o material purulento que contiene gránulos o granos de tonalidad blanquecina. Las lesiones característicamente se diseminan hacia los tejidos circundantes, lo que induce aumento de la tumefacción, formación de nuevos trayectos fistulosos y drenaje diario de material líquido. En fases avanzadas, el proceso infeccioso puede comprometer el tejido óseo subyacente y ocasionar periostitis y lesiones osteolíticas [6,23].

1.9 Antecedentes sobre la respuesta inmune contra *Nocardia brasiliensis*

La respuesta inmune desencadenada por *Nocardia brasiliensis* ha sido estudiada desde múltiples aproximaciones experimentales a lo largo de las últimas dos décadas. En la siguiente tabla se presenta una síntesis cronológica de los estudios más relevantes en este campo, desde el establecimiento del modelo murino en 1999 hasta las contribuciones más recientes en 2026.

Tabla 3 Antecedentes sobre la respuesta inmune contra *Nocardia brasiliensis*.

Hallazgo principal	Referencia
Modelo murino BALB/c; antígenos P24/P61; respuesta mixta Th1/Th2 Anticuerpos IgM-IgG confieren protección	[23]
Anticuerpos monoclonales IgM protectores	[25]
Microambiente inmunosupresor (Treg/IL-10)	[26]

Hallazgo principal	Referencia
Lípidos de pared celular modulan respuesta inmune	[27]
Formación de células espumosas (<i>foam cells</i>)	[28]
Generación de centros germinales por antígenos de <i>Nocardia brasiliensis</i>	[29]
Óxido nítrico promueve patogénesis del actinomicetoma	[30]
Aumento de la expresión de PD-1–PD-L1, asociado al agotamiento de los linfocitos, en el tejido infectado.	[31]
Respuesta inmune desregulada y su efecto en la formación y establecimiento del actinomicetoma.	[32]
Cepa atenuada NBP200; respuesta protectora	[33]

La investigación sobre la respuesta contra *Nocardia brasiliensis* ha evolucionado desde la caracterización inicial del modelo murino y la identificación de antígenos inmunodominantes [23,25], hasta el descubrimiento de mecanismos de inmunosupresión inducida por la bacteria y el papel patogénico del óxido nítrico [26,30]. El desarrollo reciente de una cepa atenuada (NBP200) ha abierto nuevas perspectivas para comprender los mecanismos de protección y el desarrollo de estrategias profilácticas. Pese a los valiosos estudios referentes a la respuesta inmune contra *Nocardia brasiliensis* generados hasta el día de hoy, aún siguen interrogantes sobre la naturaleza concreta del desarrollo del actinomicetoma en donde diversos actores y mecanismos celulares participan en conjunto para el desarrollo de la enfermedad. Uno de estos elementos que forma parte de la respuesta inmune innata, responsable de una respuesta temprana contra *Nocardia brasiliensis* y del cual aún se desconoce su papel en la patogenia del actinomicetoma son las células cebadas.

1.10 Células cebadas y su papel en el control de infecciones

El sistema inmune confiere protección al individuo contra patógenos a través de la inmunidad tanto innata como adaptativa. La inmunidad innata comprende estructuras anatómicas preexistentes como barreras físicas (piel y mucosas) así como de sustancias propias del organismo que conforman las barreras químicas (lágrimas, enzimas, moléculas solubles, secreciones) y células como células dendríticas, neutrófilos, macrófagos, células linfoides innatas y células cebadas [34].

Las células cebadas son uno de los principales elementos de la inmunidad innata, proporcionan la primera línea contra los patógenos. Son células del linaje mieloide y se encuentran principalmente en órganos y tejidos que fungen como interfase con el medio ambiente como la piel y las mucosas. Su activación y degranulación modula significativamente varios aspectos fisiológicos como la vasodilatación, la homeostasis vascular, la respuesta inmune, la angiogénesis y la desintoxicación del veneno. Dentro de sus mecanismos efectores en el combate de infecciones destacan la fagocitosis, producción de histamina, citocinas, quimiocinas, proteasas y radicales libres [35]. Por otro lado, las células cebadas han sido implicadas en la fisiopatología de múltiples enfermedades por alergias como asma, anafilaxia, trastornos gastrointestinales, algunos tipos de neoplasias malignas y enfermedades cardiovasculares.

1.11 Características biológicas y fenotípicas de las células cebadas

Las células cebadas son leucocitos del linaje mieloide que se originan a partir de progenitores hematopoyéticos en médula ósea. Contrario de otros granulocitos como neutrófilos, eosinófilos y basófilos que completan su diferenciación en médula ósea y circulan como células maduras en sangre periférica, las células cebadas abandonan la circulación sanguínea como progenitores inmaduros agranulares y terminan su maduración en tejidos periféricos, donde residen de manera permanente, desarrollando sus gránulos solo después de su entrada a los tejidos [36,37]. En humanos, los progenitores de células cebadas circulantes (MCps, *mast cell progenitors*) han sido definidos como células CD34⁺ que coexpresan c-Kit (CD117) y FcεRI, el receptor de alta afinidad para IgE [38]. Esta capacidad funcional temprana posiciona a los MCps como células competentes para participar en respuestas inmunes incluso antes de completar su

maduración tisular. El proceso de maduración tisular de las células cebadas depende críticamente del receptor c-Kit , una tirosina quinasa tipo III codificada por el protooncogén *c-KIT*, y de su ligando, el factor de células madre (SCF, *stem cell factor*), producido por células del estroma en los tejidos diana. La interacción de SCF a c-Kit es esencial para la supervivencia, proliferación, diferenciación y activación de las células cebadas [39,40]. En cuanto a su morfología, las células cebadas en estado quiescente presentan un tamaño que oscila entre 10 y 15 μm , aunque pueden alcanzar dimensiones mayores tras la activación y degranulación. Una de sus características morfológicas más distintivas es la presencia de un citoplasma densamente granulado, que contiene entre 50 y 200 gránulos secretorios donde se almacenan diversos mediadores preformados como histamina, proteasas neutras, proteoglicanos y citocinas listos para ser liberados en cuestión de segundos tras la estimulación adecuada [35,36]. Estas células poseen una vida prolongada en los tejidos, que puede extenderse desde semanas hasta varios meses, dependiendo del microambiente y de las señales de supervivencia recibidas, particularmente a través del eje SCF/c-Kit [35].

En condiciones homeostáticas, la población de células cebadas en los tejidos se mantiene mediante proliferación local de células cebadas residentes; sin embargo, durante procesos inflamatorios, este equilibrio se modifica y el mantenimiento ocurre fundamentalmente a través del reclutamiento de progenitores desde la médula ósea hacia los tejidos diana. Dicho reclutamiento requiere la acción coordinada de integrinas como $\alpha 4\beta 7$ y moléculas de adhesión como VCAM-1, así como de los receptores de quimiocinas CXCR2 y CCR-2 y su ligando CCL-2 [40,41]. Una vez que estos progenitores alcanzan su maduración en el tejido proceso que depende nuevamente del eje SCF/c-Kit adquieren la capacidad de activarse y degranular, perpetuando así la respuesta inflamatoria.

En lo que respecta a sus características fenotípicas, las células cebadas expresan una amplia y diversa variedad de receptores que les permite detectar y responder a múltiples señales del microambiente. A parte del receptor clásico Fc ϵ RI de alta afinidad para IgE protagonista en las reacciones alérgicas, expresan receptores para IgG (Fc γ R), receptores para IgA (Fc α R), receptores tipo Toll (TLR) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), receptores para el complemento (C3aR,

C5aR), el receptor Mrgprbx2 (Mrgprb2 en ratones) implicado en la activación independiente de IgE por péptidos catiónicos y fármacos, así como receptores para diversas citocinas y quimiocinas [36,42,43]. La expresión de c-Kit en su superficie constituye, además de un requisito para su supervivencia y diferenciación, un marcador fenotípico distintivo que permite identificar y caracterizar a estas células a través de citometría de flujo o inmunohistoquímica [36].

Esta diversidad en la expresión de receptores confiere a las células cebadas una notable capacidad de integración de señales, provenientes tanto del sistema inmune innata (a través de PAMPs, DAMPs, anafilotoxinas del complemento y neuropéptidos) como del adaptativo (a través de IgE e IgG) posicionándose como sensores inmunológicos estratégicamente ubicados en la interfaz entre el huésped y el ambiente [43,44]. Si bien clásicamente se ha vinculado a las células cebadas con la fisiopatología alérgica, su biología fundamental revela un papel mucho más amplio que incluye la vigilancia inmunológica, la homeostasis tisular, la reparación de tejidos y la defensa antimicrobiana.

1.12 Clasificación de las células cebadas en humanos y ratón

La heterogeneidad de las células cebadas ha sido reconocida durante décadas, y tradicionalmente se han clasificado según el contenido de proteasas granulares y su localización tisular [45–47]. En humanos, la clasificación clásica distingue dos subtipos principales basados en la expresión de triptasa y quimasa. Las que expresan, exclusivamente triptasa se conocen como MCT (Triptasa) y se localizan predominantemente en mucosas (pulmón e intestino), y las que coexpresan triptasa, quimasa, carboxipeptidasa A3 (CPA3) y catepsina G, se conocen como MCTC (Tryptasa-Quimasa), residen preferentemente en tejido conectivo (piel y submucosa) [48,49]. Sin embargo, esta dicotomía clásica ha sido recientemente superada por estudios transcriptómicos de alta resolución, en donde a través de análisis de secuenciación de ARN de una sola célula (scRNA-seq), se han revelado una diversidad fenotípica mucho mayor, identificando seis grupos transcripcionales de células cebadas humanas (MC1–MC6) con distribuciones tisulares específicas: MC1 se enriquece en piel y pulmón, MC5 en ganglios linfáticos y vasculatura, MC2, MC3 y MC4 en piel y vejiga, y MC6 en tráquea

y pulmones [50]. Este hallazgo amplía la clasificación clásica MCT/MCTC, revelando al menos seis poblaciones con posibles funciones especializadas según su nicho.

En ratones, la clasificación tradicional distingue las células cebadas de tipo conectivo (CTMCs) y las células cebadas de tipo mucoso (MMC), aunque estudios recientes han refinado esta clasificación identificando poblaciones basadas en la expresión de *Mrgprb2* [50,51]. Esta creciente comprensión de la heterogeneidad de las células cebadas impulsada por tecnologías de transcriptómica unicelular ha revelado que estas células poseen una plasticidad funcional mucho mayor de lo que se pensaba, con implicaciones significativas en el contexto de la protección, la homeostasis tisular, la defensa antimicrobiana [49,50,52,53]. En la siguiente tabla, se presenta un resumen que sintetiza la localización de los principales tipos de células cebadas en ambas especies (Tabla 4).

Tabla 4 Clasificación de células cebadas en humanos y modelo murino.

Especie	Clasificación	Localización	Referencia
Humanos	MCT	Mucosa pulmonar e intestinal	[54]
	CTMC	Piel, tejido conectivo, submucosa	[37]
	scRNA-seq	Distribución específica por órgano (vejiga, pulmón, piel)	[50]
Ratones	CTMC <i>Mrgprb2</i> ⁺	Piel, cavidad peritoneal, submucosa	[50,55]
	MMC <i>Mrgprb2</i> ⁻	Mucosa pulmonar e intestinal	

CTMC, Célula cebada de tejido conectivo; **MCT**, Célula Cebada productora de triptasa; **MCTC**, Célula cebada productora de triptasa/quimasa; **MMC**, Célula cebada de mucosa; ***Mrgprb2*^{+/−}**, receptor de proteína G acoplado a Mas b2; **scRNA-seq**, Secuenciación de ARN de célula única.

1.13 Activación clásica: mecanismo de desgranulación

Una vez que las células cebadas son activadas a través de la interacción IgE- FcεRI liberan mediadores preformados en cuestión de segundos y sintetizan *de novo* otros en minutos. El receptor FcεRI posee una afinidad aproximadamente 100 veces mayor por la porción Fc de la IgE que por la de la IgG; en consecuencia, la IgE permanece constitutivamente

unida a FcεRI en las células cebadas incluso en ausencia de antígeno, lo que confiere a la respuesta una velocidad excepcional ante el estímulo antigénico [36].

La señalización a través de FcεRI se inicia con la fosforilación dependiente de la quinasa Lyn en los motivos ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) localizados en las subunidades β y γ del receptor. La quinasa Syk es reclutada por los ITAM fosforilados, activándose y autofosforilándose subsiguientemente. A su vez Syk fosforila al enlazador de activación de células T (LAT) y al enlazador de activación de células no T (NTAL). LAT fosforila a la fosfolipasa C (PLC), la cual genera inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), induciendo la movilización de calcio intracelular y la activación de la proteína quinasa C (PKC). Paralelamente, NTAL activa al fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), contribuyendo también a la liberación de calcio. Esta cascada de señalización culmina en tres procesos efectores: desgranulación, producción de mediadores lipídicos y síntesis de citocinas [56].

1.14 Desgranulación y mediadores preformados

La desgranulación ocurre segundos después del entrecruzamiento del IgE- FcεRI resulta en la liberación de proteasas neutras como triptasa, quimasa y carboxipeptidasa, que activan metaloproteasas de la matriz extracelular (MMP) responsables de la remodelación del tejido conjuntivo. La β-triptasa escinde la IgE una vez activada la célula cebada, ejerciendo una función reguladora negativa sobre la respuesta alérgica [57].

Sin embargo, la histamina, es el mediador más relevante liberado por las células cebadas y típicamente asociado con la fisiopatología alérgica, se deriva del aminoácido histidina e induce activación celular mediante cuatro receptores (H1, H2, H3 y H4). La estimulación del receptor H1 induce la reacción alérgica clásica. Dicho receptor se expresa en células musculares lisas y endoteliales; su activación en endotelio aumenta la permeabilidad vascular, mientras que en músculo liso provoca contracción, broncoconstricción y secreción mucosa [58].

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), es una citocina inflamatoria almacenada en los gránulos preformados de las células cebadas; activa macrófagos, células endoteliales y la síntesis de otras citocinas. Cuando se une a las células endoteliales induce una mayor

expresión de moléculas de adhesión, facilitando la unión de leucocitos al endotelio y su posterior extravasación hacia el foco inflamatorio [59]. Este proceso se ve potenciado por la acción de numerosos mediadores liberados o sintetizados por las células cebadas, los cuales ejercen un efecto quimiotáctico sobre distintos tipos de leucocitos incluyendo neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos Th2 reclutándolos activamente al sitio dañado amplificando la respuesta inflamatoria [35]. Paralelamente, estos mediadores incrementan la permeabilidad vascular, permitiendo el paso de las células inmunitarias desde el torrente sanguíneo hacia el tejido afectado. Es importante destacar que, una vez que se desgranula la célula cebada se sintetizan los mediadores y regeneran sus gránulos, recuperando así su capacidad funcional para futuros estímulos [60].

1.15 Activación no clásica: Mecanismos independientes de IgE

Además del receptor FcεRI, las células cebadas pueden activarse por una amplia variedad de receptores de membrana, incluyendo FcαR, FcγR, receptores para adenosina, C3a, quimiocinas, citocinas, TLR y Mrgprx2 [43].

Entre las vías de activación independientes de IgE, destaca el receptor Mrgprx2, expresado predominantemente en células cebadas humanas y (Mrgprb2, el ortólogo funcional en modelos murinos) [42]. La identificación y caracterización de este receptor apoyaron a resolver un enigma en inmunología clínica que se refiere al mecanismo que subyace a las reacciones pseudoalérgicas a fármacos neuromusculares, fluoroquinolonas, vancomicina y péptidos endógenos de naturaleza catiónica (sustancia P, LL-37) lo cual desencadena cuadros clínicos que mimetizan una alergia, pero ocurren en ausencia de anticuerpos IgE específicos [61,62]. Adicionalmente, el estrés oxidativo y la mitocondria juegan un rol esencial en la desgranulación no canónica, debido a que la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) es necesaria para la exocitosis, y los antioxidantes reducen este proceso [63].

1.16 Síntesis *de novo* de mediadores

Además de los mediadores preformados liberados por desgranulación, las células cebadas activadas inician la síntesis *de novo* de una variedad de moléculas que amplifican y perpetúan la respuesta inflamatoria. Estos mediadores se producen minutos u horas

después de la activación y se clasifican fundamentalmente en citocinas, quimiocinas, eicosanoides y factor activador de plaquetas (PAF) [64].

1.17 Citocinas y quimiocinas

Las células cebadas sintetizan y liberan diversas citocinas y quimiocinas, entre las que se incluyen CCL3, GM-CSF, IL-3, IL-5 e IL-6, moléculas clave en la quimiotaxis y activación de otras células inmunitarias como eosinófilos, neutrófilos y macrófagos en el sitio inflamatorio, amplificando así la respuesta [36].

1.18 Eicosanoides

Los eicosanoides prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos se producen a partir de la conversión catalítica del ácido araquidónico, este se libera de los fosfolípidos de membrana mediante la fosfolipasa A2 (PLA2) [65]. Las células cebadas expresan las enzimas ciclooxigenasa 1 (COX-1) y ciclooxigenasa 2 (COX-2), las cuales convierten el ácido araquidónico en prostaglandinas y tromboxanos mediante la acción de isomerasas específicas [66]. Adicionalmente, la 5-lipooxigenasa (5-LOX) convierte el ácido araquidónico en leucotrienos. Los eicosanoides actúan predominantemente en el área local de desgranulación de las células cebadas, ejerciendo efectos paracrinos [67]. Las prostaglandinas regulan la permeabilidad vascular y modulan la respuesta inflamatoria [66]), mientras que los leucotrienos intervienen en la contracción del músculo liso, la constricción de las vías respiratorias y la secreción mucosa [67].

1.19 Factor activador de plaquetas

El factor activador de plaquetas (PAF) es un mediador lipídico sintetizado *de novo* tras la activación de las células cebadas. Actúa como un potente factor quimiotáctico para leucocitos y activa directamente neutrófilos, eosinófilos y plaquetas, participando en la amplificación de la respuesta inflamatoria y a la trombosis local [68].

1.20 Más allá de la alergia: el papel antimicrobiano de las células cebadas

Como se mencionó anteriormente, las células cebadas han sido estudiadas por su papel protagonista en las reacciones alérgicas. Sin embargo, una creciente línea de evidencia ha comenzado a revelar un panorama más amplio sobre sus funciones, posicionándose como

efectores versátiles de la inmunidad innata. Esta función se debe, en gran medida, a su localización estratégica en tejidos de interfaz con el ambiente, como piel y mucosas respiratoria y gastrointestinal, que constituyen precisamente los sitios de entrada de patógenos [69–74]. Su activación, ya sea por vía clásica (IgE/FcεRI) o independiente de IgE (receptores Mrgprx2, TLRs, PAMPs bacterianos), desencadena una batería de mecanismos antimicrobianos que incluyen fagocitosis directa, liberación de proteasas y péptidos antimicrobianos, producción de radicales libres, secreción de TNF-α y formación de trampas extracelulares (MCETs) [35,75–77]. Esta convergencia funcional no es casualidad. La misma maquinaria de desgranulación que en un contexto alérgico libera histamina y leucotrienos para causar broncoconstricción, en un microambiente infeccioso libera moléculas con capacidad bactericida directa y recluta neutrófilos, macrófagos y otras células efectoras al sitio de infección [78–80]. Es decir, el "arsenal" de las células cebadas, sus gránulos preformados y su capacidad de síntesis *de novo* representa un sistema de defensa dual: por un lado, responde a alérgenos y, por otro, combate patógenos (de forma protectora) [81].

En los últimos años, los trabajos referentes a su papel antimicrobiano han desarrollado un consenso creciente sobre la importancia de estas células como componentes críticos en la defensa del huésped frente a infecciones bacterianas [43]. Este cambio de paradigma ha impulsado el estudio de las células cebadas en contextos infecciosos específicos, incluyendo micobacterias [74,82–85], parásitos [69,86–88] y bacterias cutáneas [89–91], abriendo nuevas preguntas sobre su participación en enfermedades infecciosas crónicas como el actinomicetoma.

2. ANTECEDENTES

2.1 Ausencia de información para nocardiosis

Hasta la fecha, no existe ningún trabajo de investigación que describa la participación de las células cebadas en la patogenia del actinomicetoma causado por *Nocardia brasiliensis*. Sin embargo, se dispone de información sobre la interacción de estas células con diversos patógenos bacterianos, destacando particularmente los hallazgos en infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* [74,83–85,92], una bacteria filogenéticamente emparentada con *Nocardia brasiliensis*. Ambas pertenecen al orden de los Mycobacteriales y comparten características clave: son patógenos intracelulares facultativos, inducen la formación de granulomas como parte de la respuesta del huésped y establecen infecciones crónicas que persisten durante meses o años. Estas similitudes posicionan a *Mycobacterium tuberculosis* como un modelo relevante para orientar el estudio del papel de las células cebadas en la nocardiosis, a pesar de las diferencias en sus paredes celulares y espectro clínico [93].

2.2 Reconocimiento de patógenos y mecanismos efectores antimicrobianos

Las células cebadas expresan una variedad de PRRs que les permite detectar directamente a los patógenos en ausencia de opsoninas [43]. Entre los que destacan los TLR2 y TLR4, que reconocen componentes de la pared bacteriana como lipopéptidos, peptidoglicano y lipopolisacárido (LPS) [94]. En el contexto de infección in vitro de células cebadas, por *Listeria monocytogenes* se induce la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-13, así como la activación de las vías de señalización de p38 MAPK y NF- κ B [73]. Por lo que los autores sugieren que la producción de IL-6 e IL-13 dependen de TLR2 y p38, mientras que la degranulación, la producción de ROS, la endocitosis y la eliminación de bacterias son independientes de este receptor [73].

Una vez activadas in vitro, las células cebadas despliegan múltiples efectores frente a *Listeria monocytogenes*, demostrado que esta bacteria induce la formación de trampas extracelulares de células cebadas (MCETs) dependientes de NADPH oxidasa, compuestas por ADN nuclear, histonas, triptasa y β -hexosaminidasa, con actividad antimicrobiana directa [95].

Además de los TLRs, las células cebadas utilizan otros receptores para reconocer micobacterias; uno de ellos es el CD48, una molécula anclada a GPI, es un receptor crítico para la activación in vitro por *Mycobacterium tuberculosis*, ya que su bloqueo abroga la liberación de histamina [82]. Posteriormente, el mismo grupo demostró que la entrada de *Mycobacterium tuberculosis* en las células cebadas ocurre a través de microdominios de membrana ricos en colesterol (*lipid rafts*), un mecanismo de internalización que podría ser aprovechado por la bacteria para evadir la destrucción lisosomal [92].

La relevancia funcional de TLR2 en la función antimicrobiana de las células cebadas fue establecida por Carlos y colaboradores en 2009, a través de un modelo de infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Teniendo en cuenta que las células cebadas expresan TLR2, mediante transferencia adoptiva, demostraron que ratones (TLR2^{-/-}) son altamente susceptibles a la infección, con alta carga bacteriana y escasa formación de granulomas. La transferencia de células cebadas (TLR2^{+/+}) restauró el control de la infección, normalizó la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6, y restableció la formación de granulomas y el “*homing*” de linfocitos T CD8⁺ activados [83].

Las células cebadas también actúan contra otro tipo de bacterias como *Streptococcus pyogenes*, así lo demostraron Nardo y colaboradores en 2008; a través de modelos murinos de infección deficientes de células cebadas (Kit^{W-sh/W-sh}). Observaron que los ratones deficientes de células cebadas son susceptibles a la infección con *Streptococcus pyogenes*, sin embargo, cuando realizaron una reconstitución adoptiva de células cebadas provenientes de ratones control (wild-type) se restauró el control de la infección, mientras que la reconstitución con células cebadas deficientes en catelicidina (Camp^{-/-}) lo hizo parcialmente. Además, demostraron que las células cebadas activadas por IL-4 procesan la catelicidina generando un péptido más pequeño (IGE24) con potente actividad bactericida contra *Staphylococcus aureus* y *S. pyogenes* [90].

Además, se ha descrito que los receptores Mrgprb2 (ratón) y Mrgprx2 (humano) reconocen moléculas de “*quorum sensing*” (QSMs) producidas por bacterias Grampositivas [79]. Específicamente, el péptido CSP-1 de *Streptococcus pneumoniae* activa Mrgprb2 induciendo degranulación y liberación de mediadores antimicrobianos, lo que inhibe el crecimiento bacteriano y previene la formación de

biopelículas. Los ratones deficientes en *Mrgprb2* son más susceptibles a *S. pneumoniae*, *Enterococcus faecium* y *Streptococcus pyogenes* [79].

En conjunto, estos hallazgos posicionan a las células cebadas como sensores versátiles capaces de detectar patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, entre otros a través de TLR2, TLR4, CD48 y *Mrgprb2*, y desplegar un repertorio efector diverso que contribuye al control de infecciones bacterianas.

2.3 Células cebadas en la transición a la persistencia bacteriana

A pesar del conocimiento acumulado sobre los mecanismos de activación de las células cebadas frente a infecciones agudas, su papel en infecciones crónicas permanece prácticamente inexplorado. Este vacío es evidente para *Nocardia brasiliensis*, la principal bacteria responsable del actinomicetoma. Dado que *N. brasiliensis* y *Mycobacterium tuberculosis* pertenecen al orden de los Mycobacteriales y comparten la capacidad de inducir la formación de granulomas, mecanismo histopatológico que subyace a la cronicidad de estas infecciones, los hallazgos reportados para tuberculosis tanto pulmonar como cutánea, así como los experimentos *In vitro* e *In vivo* constituyen el referente más cercano para orientar el estudio de la nocardiosis. Por ello a continuación, se revisa la evidencia disponible sobre células cebadas en infección por *Mycobacterium tuberculosis*, con el fin de sentar las bases para investigar su rol en la infección por *Nocardia brasiliensis*.

2.4 Células cebadas en el control de infecciones crónicas por bacterias intracelulares: el caso de *Mycobacterium tuberculosis*

El estudio de la tuberculosis humana ha añadido una capa de complejidad al entendimiento del papel de las células cebadas. García Rodríguez y colaboradores en 2021, analizaron muestras de autopsias de pacientes con tuberculosis pulmonar (TBP) y encontraron que las células cebadas se localizan en la periferia de granulomas y tejido fibrótico. Demostraron que las células cebadas en estas lesiones expresan IL-17A (en granulomas tempranos) y TGF- β (en áreas fibróticas). Observaron un predominio de células cebadas que co-expresan triptasa y quimasa (MCTC) en tejido fibrótico. Este hallazgo sugiere que

las células cebadas no solo participan en la fase inflamatoria temprana (vía IL-17), sino que también contribuyen a la fibrosis tardía a través de TGF- β y proteasas como la quimasa [96].

En este mismo sentido, el estudio de Gupta y colaboradores en 2025 demostraron mayor producción de quimasa en células cebadas de granulomas de humanos y macacos con TBP. En ratones, la deficiencia de células cebadas mejoró el control de la infección y redujo la inflamación pulmonar en fases crónicas. La transferencia de células cebadas a la vía aérea aumentó la infiltración de neutrófilos y la diseminación de *Mycobacterium tuberculosis* al bazo, sugiriendo que, en determinados contextos, las células cebadas pueden promover la patogénesis en lugar de controlar la infección [85].

La evidencia disponible sobre el papel de las células cebadas en TBP presenta aparentes contradicciones. Por un lado, estudios de Carlos y colaboradores en 2009 demuestran su papel protector mediante transferencia adoptiva de células cebadas TLR2^{+/+} [83]. Mientras que Villarreal Rivota y colaboradores en 2025 utilizando ratones Kit^{W-sh/W-sh} deficientes de células cebadas, reportaron mayor carga bacteriana en pulmón y bazo, menor número de granulomas y alteraciones en el perfil de citocinas séricas (incremento de IL-4, IL-5 e IL-22 en fase temprana; y de IFN- γ , IL-9, IL-10 e IL-21 en fase tardía), lo que también apunta a un rol protector de las mismas [74]. En contraste, Gupta y colaboradores en 2025 sugieren un papel patológico, al observar que dicha deficiencia mejoró el control de la infección y redujo la inflamación pulmonar en fases crónicas, y que la transferencia de estas células aumentó la diseminación bacteriana al bazo [85]. Estas diferencias pueden explicarse por variaciones en los modelos experimentales: dosis de infección, cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, tiempos de análisis y, crucialmente, el hecho de que la deficiencia en los ratones Kit^{W-sh/W-sh} afecta también otras poblaciones celulares [97]. No obstante, los tres estudios coinciden en que las células cebadas modulan activamente la respuesta inmune, y que su papel neto protector o patológico depende del contexto experimental y de la fase de la infección.

2.5 El modelo murino $Kit^{W-sh/W-sh}$ (Wsh) para el estudio de la función antimicrobiana de las células cebadas

Los ratones C57BL/6- $Kit^{W-sh/W-sh}$ (Wsh) poseen una inversión cromosómica de aproximadamente 3.1 megabases (Mb) en la región reguladora ubicada corriente arriba del gen *KIT* (cromosoma 5). El punto de ruptura 3' se localiza a 67.5 kilobases (kb) corriente arriba del inicio del sitio de transcripción del gen *KIT*, interrumpiendo un *locus control region* (LCR) esencial expresar este receptor en células cebadas [97,98]. Como consecuencia, los animales homocigotos presentan una deficiencia profunda de células cebadas en todos los tejidos examinados, incluyendo piel, cavidad peritoneal, tracto gastrointestinal y pulmón. En la piel dorsal de animales de 10-12 semanas, el número de estas células se reduce a menos del 2% de los niveles observados en ratones silvestres, una deficiencia que se mantiene estable durante toda la vida adulta [99].

2.6 Limitaciones y ventajas del modelo Wsh

Sin embargo, la inversión de 3.1 Mb no afecta exclusivamente a *KIT*. El punto de ruptura 5' se localiza dentro del gen *corin*, entre las bases C y G, entre los exones 5 y 6, que codifica para una proteasa cardíaca responsable de la activación del péptido natriurético auricular [97]. Como consecuencia, los ratones Wsh presentan:

- Hipertrofia cardíaca (aumento del peso cardíaco relativo)
- Esplenomegalia con expansión de poblaciones mieloides $CD11b^+/Gr-1^+$
- Neutrofilia y trombocitosis circulantes

Estas anormalidades hematopoyéticas deben ser consideradas al interpretar experimentos, especialmente aquellos que involucran respuestas inflamatorias sistémicas [97].

A diferencia del modelo clásico $Kit^{W/W-v}$ (Wv), que presenta una mutación en la región codificante de *KIT* que afecta la función intrínseca del receptor, los ratones Wsh ofrecen ventajas significativas (Tabla 5):

Tabla 5 Comparación de modelos murinos deficientes de células cebadas.

Característica	<i>Kit^{W/W^{-V}}</i> (Wv)	<i>Kit^{W^{-sh}/W^{-sh}}</i> (Wsh)
Mutación	Mutación puntual en dominio tirosina quinasa	Inversión en región reguladora <i>upstream</i> de <i>KIT</i>
Anemia	Sí (macrocítica)	No
Fertilidad	Estériles	Fértiles
Linfocitos T $\gamma\delta$ intraepiteliales	Disminuidos con la edad	Normales
Dermatitis espontánea	Alta incidencia	Ausente
Fondo genético	Mixto (WBB6F1)	C57BL/6 (isogénico)

Además, los ratones Wsh no presentan úlceras gástricas ni papilomas escamosos de estómago que afectan a los ratones *Kit^{W/W^{-V}}*, lo que los hace más adecuados para estudios de larga duración, como los requeridos en modelos de infección crónica [99].

Adicionalmente, mientras que los *Kit^{W/W^{-V}}* se mantienen típicamente en un fondo genético mixto (WBB6F1), los *Kit^{W^{-sh}/W^{-sh}}* se encuentran en un fondo C57BL/6 isogénico, lo que reduce la variabilidad experimental y facilita la comparación con otros modelos transgénicos ampliamente utilizados en inmunología. Estas características, junto con la ausencia de las patologías espontáneas del modelo Wv, posicionan a los ratones Wsh como una herramienta más específica y robusta para el estudio de los mastocitos en la respuesta inmune frente a patógenos intracelulares [99–101].

3. JUSTIFICACIÓN

Las células cebadas modulan significativamente la homeostasis de órganos y tejidos que sirven de interfase con el medio ambiente como la piel y las mucosas, por lo que sus funciones efectoras son clave para iniciar la respuesta del huésped contra patógenos. Se conoce que las células cebadas participan en la respuesta inmune innata y adquirida en infecciones por bacterias intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo, el papel de las células cebadas en la inmunopatogenia del modelo experimental por *Nocardia brasiliensis* es desconocido.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS

4.1 Pregunta de Investigación

¿La ausencia de células cebadas afecta el desarrollo de la fase crónica del actinomictoma por *Nocardia brasiliensis* en ratones C57BL/6?

4.2 Hipótesis

Las células cebadas participan en la fase crónica del actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* en un modelo experimental de ratones C57BL/6.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar la participación de las células cebadas en el establecimiento y evolución del actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* en un modelo experimental.

5.2 Objetivos específicos:

1. Estudiar la evolución clínica de la lesión en ausencia de células cebadas en el actinomicetoma crónico por *Nocardia brasiliensis* en un modelo experimental.
2. Evaluar los cambios histopatológicos en la ausencia de células cebadas en el actinomicetoma crónico por *Nocardia brasiliensis* en un modelo experimental.
3. Analizar la inmunidad celular innata y la adaptativa en el actinomicetoma crónico por *Nocardia brasiliensis* en un modelo experimental.
4. Evaluar la respuesta de las células cebadas en infección *in vitro* por *Nocardia brasiliensis*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental

Se utilizaron 36 ratones: 18 ratones C57BL6 WT y 18 ratones C57BL6 (Kit^{W-sh/W-sh}) hembras de 12 semanas, se dividieron en 2 tratamientos (infectados e infectados). A su vez se distribuyeron en dos días de sacrificio con una n=6 por día (30 dpi. y 72 dpi. respectivamente) por tratamiento [23]. En la tabla 6 se muestran los grupos, días de sacrificio y el número de animales.

Tabla 6 Distribución de ratones por grupos de trabajo.

Día de sacrificio	Grupo 1: (WT)	Grupo 2: C57BL6(Kit ^{W-sh/W-sh})
Día 0 Infección (-)	6	6
Día 30 Infección (+)	6	6
Día 72 Infección (+)	6	6
Total:		36 Ratones

En este trabajo se utilizaron ratones C57BL6 (WT) y C57BL6-(Kit^{W-sh/W-sh}) hembras de 12 semanas de edad, con un peso promedio de 20-25 g. Los animales se mantuvieron en cajas acrílicas con un encamado de aserrín esterilizado en autoclave bajo calor húmedo a 121°C/15 lbs. La temperatura ambiente se mantuvo entre 20-25°C, con una alimentación basada en nutricubos (Purina México S.A. de C.V.) así como agua destilada estéril *ad libitum*. Los ratones fueron mantenidos en el área de reproducción y experimentación en bioterio libre de patógenos perteneciente al Servicio de Inmunología de la Facultad de Medicina, UANL.

6.2 Modelo de infección de *Nocardia brasiliensis*.

Evolución clínica del desarrollo del micetoma

La cepa utilizada en este proyecto fue *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1, con número de ATCC 700358. La bacteria se obtuvo del Departamento de Dermatología del Hospital Universitario “José Eleuterio González”, procedente de un paciente diagnosticado con actinomicetoma.

La evaluación clínica realizada de forma macroscópica; tuvo como objetivo identificar lesiones características del actinomicetoma (úlceras, abscesos, dilatación de vasos sanguíneos, fístulas). En lo que respecta al volumen de lesión, la medición se realizó con Vernier para calcular la inflamación en cm³; esto a través del uso de la ecuación elipsoidea (ancho x alto x largo de la pata) multiplicando el producto por el factor 0.5235999 [102].

Llegado el día de sacrificio calendarizado en el protocolo, se procedió a realizar la eutanasia de los animales a través de la administración de Ketamina/Xilacina con 100 µL de una proporción 10:1 (mg:mg) a partir de la dosis establecida de sedación 60/6 [103]. La muerte del animal fue confirmada al evaluar la pérdida de signos de anestesia en los que se incluyen el reflejo de pedal en miembros anteriores, reflejo de pellizco en la cola y posteriores, así como reflejo de la córnea [104].

6.3 Microbiología: Preparación del inóculo de *Nocardia brasiliensis*

La bacteria *Nocardia brasiliensis* aislada de un actinomicetoma de un ratón con 45 días de infección, fue cultivada en caldo infusión cerebro corazón (BHI) a 37°C por 3 días con agitación moderada. Después fue recuperada y lavada con solución salina estéril y se centrifugó a 3500 rpm/5 min en dos ciclos.

La biomasa fue resuspendida en 10 mL de solución salina y fue transferida a un homogenizador tipo Potter-Elvehjem estéril con el objetivo de triturar la biomasa bacteriana hasta obtener una suspensión homogénea la cual se ajustó a una concentración de 20 mg/50 µL biomasa. Una vez obtenido el inóculo, se inyectaron 0.05 mL en el miembro posterior izquierdo del ratón.

6.4 Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Una vez cumplido el día de sacrificio calendarizado previamente se procedió a sacrificar a los ratones a través del método de eutanasia previamente descrito. Se utilizó una porción del micetoma del miembro posterior izquierdo para la cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y se procesó de la siguiente forma. Se tomó una porción equivalente a 100 µg del tejido de micetoma, la cual se colocó en un vial con 900 µL de solución salina fisiológica. Con ayuda de una varilla de vidrio estéril se procedió a macerar el tejido hasta obtener una suspensión homogénea. Una vez que el tejido fue

homogeneizado, se procedió a realizar diluciones seriadas de la suspensión hasta 10^5 . Después de realizar las diluciones, se realizó su siembra por triplicado en agar BHI mediante la técnica de microdilución sembrando 10 μL por repetición. El agar fue previamente acondicionado con Kanamicina 3000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y Ampicilina 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el crecimiento selectivo de *Nocardia brasiliensis*. La placa previamente cuadrículada y los cuadros deben medir un cm^2 de área. Las placas se cultivaron a 37°C por 72 horas. Para estimar el número de UFC/g de tejido en las muestras sembradas, se multiplica el promedio de las 3 repeticiones por 100 así como por el factor de dilución correspondiente.

6.5 Obtención de material biológico

Una vez que los animales fueron administrados con la dosis de eutanasia, se procedió a obtener las muestras de suero requeridas antes de que el animal muriera. La técnica que se utilizó fue mediante punción cardiaca. Se utilizó una jeringa de 1 mL con una aguja calibre 27 G. Se insertó la aguja justo debajo y levemente hacia la izquierda del cartílago xifoides en la base del esternón. En un ángulo de $15\text{-}20^\circ$. Para buscar retorno, la aguja se movió levemente buscando puncionar el ventrículo izquierdo. La aguja se fija en ese punto con los dedos de forma que no sea retirada del ventrículo inadvertidamente, tanto durante la extracción, como cuando se cambie de jeringa. Una vez que se colectó la muestra, esta se vació en tubos de microcentrífuga 1 mL sin anticoagulante. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm por 10 min y se separó el suero en tubos nuevos de 1 mL. Las muestras de suero se conservaron a -80°C hasta su uso para los ensayos de cuantificación de anticuerpos IgG mediante ELISA.

En el caso del micetoma ubicado en miembro posterior izquierdo del ratón, este fue desinfectado mediante el uso de iodopovidona a través de su aplicación con movimientos circulares por 10 minutos. Una vez concluido el tiempo se procedió a obtener las muestras del micetoma mediante la separación del miembro posterior izquierdo a través de una incisión en el ligamento que separa la tibia y el fémur. Una vez separada la extremidad del ratón se procedió a obtener muestras del tejido de micetoma (con pinzas y tijeras estériles) de acuerdo con el siguiente esquema figura 3.

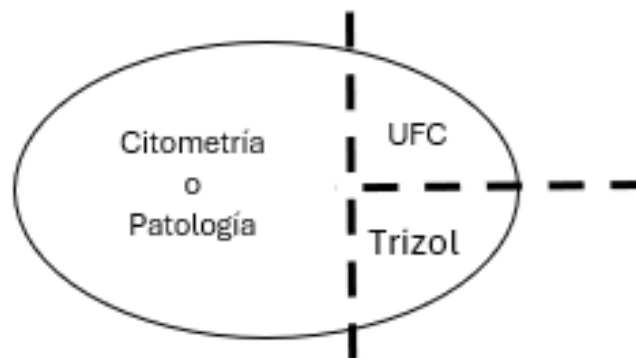


Figura. 3 Esquema para obtención de material biológico.

6.6 Cortes histológicos

Una vez obtenido el micetoma, este se colocó en formaldehído al 3.7% en PBS 1X máximo 48 h. Una vez que el tejido fue fijado se procedió a deshidratarlo de la siguiente forma: un cambio de etanol 70% (2 veces, 1 h), etanol al 80% (1 h), etanol al 95% (1 h), tres cambios de etanol (100%) de (90 min cada uno), tres cambios de xilol (90 min cada uno), dos cambios de parafina de (2 h cada uno) a 50-60°C. El tejido se incorporó en moldes con el fin de obtener un bloque de parafina. Una vez obtenido el bloque de tejido, la preparación fue colocada a -20 °C durante 20 minutos para separarlo de su molde. Los bloques de tejido fueron usados para realizar cortes de 2 a 4 µm, estos a su vez se montan sobre laminillas y fueron desparafinados en la estufa a 60°C, por espacio de 30 min. Después se retiraron de la estufa y se atemperaron a temperatura ambiente. Posteriormente fueron colocados en xileno por 10 min con tres cambios, etanol 100% con dos cambios de 3 min cada uno, etanol al 95% con un cambio de durante 1 min, etanol al 80% con un cambio de durante 1 min, etanol al 70% con un cambio de durante 1 min. Hidratados con agua destilada mediante enjuague final.

6.7 Histoquímica: Tinción de Hematoxilina y Eosina

Los cortes obtenidos fueron de 3 a 4 µm de grosor a partir de los bloques de parafina que contienen los tejidos los cuales fueron desparafinados e hidratados. Posteriormente las laminillas se colocaron en hematoxilina de Gill durante 5 min. Después se enjuagaron en alcohol-ácido al 1% y posteriormente colocados en agua amoniacal al 2% por 1 min. Una vez transcurrido el minuto, las laminillas se colocaron en eosina por 4 min. Terminado el

proceso de tinción se procedió a deshidratar el tejido, para ello las laminillas se fueron sumergiendo en etanol al 80% con dos cambios por 1 min cada uno, etanol al 95% durante 1 min. y etanol absoluto de 1 min con dos cambios de. Posteriormente las laminillas fueron colocadas en xilol por 6 min. Al finalizar se colocó una gota de medio de montaje sobre el tejido sellando con un portaobjetos.

6.8 Tinción de Azul de toluidina

Se obtuvieron cortes de 3 a 4 μm de grosor a partir de los bloques de parafina que contienen los tejidos, estos se desparafinizaron para posteriormente realizar una contratinción con Azul de Toluidina. Después de desparafinar el tejido las laminillas se sumergieron en Etanol 100%, Etanol 95%, 80% y 70% para posteriormente hidratarse completamente en agua destilada (10 repeticiones por paso) y después se colocaron en Azul de Toluidina al 0.01% durante 1 minuto. Después fueron realizados 3 lavados con agua destilada por 5 segundos cada uno. Una vez transcurridos los lavados se sumergió en Etanol al 70%, realizando 10 repeticiones de este paso. A continuación, se sumergió en Etanol al 80%, realizando 10 repeticiones de este paso. Después en Etanol 95% y finalmente en Etanol 100%, realizando las mismas repeticiones. Terminado la deshidratación del tejido se sumergió en Xilol durante 3 minutos, realizando 2 repeticiones de este paso. Por último, se colocó el medio de montaje sobre el tejido y se cubrió con un cubreobjetos teniendo cuidado de presionarlo gentilmente para remover las burbujas.

6.9 Análisis histopatológico

Una vez que realizadas las tinciones histológicas de Hematoxilina y Eosina, se procedió a observar el tejido bajo el microscopio con el fin de ejecutar el análisis a diferentes objetivos y realizar las micrografías de las estructuras presentes en los cortes, así como detallar los hallazgos representativos de cada grupo. Se realizaron exploraciones de portaobjetos completos con un escáner de portaobjetos DP200 (n.º de cat. 08303916001; Roche Tissue Diagnostics; Roche Diagnostics, Ltd.), seguidas de un análisis morfométrico a través del programa QuPath v0.5.1 [105]. La identificación de los granos de *Nocardia* en el micetoma se basó en sus características morfológicas. Se evaluó 1) el número de granos bacterianos y 2) el área ocupada por los granos en micrómetros cuadrados.

6.10 Análisis Azul de toluidina

Una vez realizada la tinción con Azul de toluidina cuyo objetivo es teñir los gránulos preformados presentes en las células cebadas se procedió a realizar su análisis. El análisis se realizó a través del programa QuPath v0.5.1 [105] con un aumento de 40x para identificar la distribución inicial de las células cebadas en la lesión y tejido circundante. La estrategia consistió en dividir la lesión del actinomietoma en 2 partes: La primera se denominó zona periférica la cual abarcó desde la epidermis hasta la dermis y la segunda zona de lesión, en donde se observaron los cambios histopatológicos más evidentes. Una vez delimitadas las zonas a evaluar se procedió a realizar la cuenta de células cebadas en las muestras correspondientes a los días de sacrificio. Para determinar el número de células cebadas por milímetro cuadrado se dividió el número de células cebadas cuantificadas entre el área total evaluada con el fin de evaluar cambios en su población a través del tiempo.

6.11 Obtención de células (Citometría de flujo)

La porción de tejido que se utilizó para la obtención de células fue colocada en medio RPMI suplementado con piruvato sódico 1 mM, glutamina, HEPES 10 mM, 1% aminoácidos no esenciales, 100 U de penicilina / ml, 100 g de estreptomicina / ml y 10% de Suero Fetal Bovino, al cual previamente se le agregó colagenasa en una dilución 1:10 para después incubarse durante 30 minutos a 37°C. Para facilitar la actividad de la

colagenasa se realizaron cortes al miembro posterior con tijeras estériles y el tejido digerido fue macerado tamizando suavemente con un émbolo a través de un colador celular estéril con un poro de 40 μm (Corning 431750) durante el tiempo de incubación. Una vez obtenidas las células se centrifugaron a 3,000 x 3 min. a 4°C. Los glóbulos rojos de la muestra fueron eliminados mediante una solución de lisis al 1X (NH_4Cl), agitando el tubo por 10 minutos a temperatura ambiente, repitiendo el paso previo de centrifugación. Posteriormente sobrenadante se descartó y el botón celular se lavó 2 veces con 10 mL de RPMI 1640. La suspensión celular se volvió a centrifugar a 3,000 x 3 min. a 4°C, se descartó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 mL de RPMI 1640 para posteriormente evaluar la concentración de células y ajustar la suspensión a 1×10^5 células por mL mediante el uso de una cámara de Neubauer.

6.12 Análisis por citometría de flujo

La suspensión celular fue centrifugada a 1,800 rpm por 10 min. a 4°C, decantando el sobrenadante para después resuspender en 1 mL de buffer de bloqueo por 30 minutos en hielo. Después se lavó con 1 mL de PBS a pH:7.4. Al terminar el lavado se procederá a centrifugar a 1800 rpm por 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se realizó el marcaje de las células agregando 1 μL de cada uno de los anticuerpos correspondientes: Anti-CD3 (APC-Cy7) Cat: 560590, Anti-LY6G/6C (PE) Cat: 553128 durante 30 minutos a 4 °C y protegida de la luz. El marcaje fue solamente para los tubos que fueron marcados como duplicados, con un tubo control sin añadir anticuerpos. Se incubó en oscuridad por 20 minutos para después agregar 1 mL de buffer de fosfatos pH: 7.2 y centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos con el fin de eliminar el exceso de anticuerpos. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 250 mL de PBS fresco con formaldehído. Los tubos fueron agitados en vórtex por 10 segundos para después realizar la adquisición de la muestra con 100.000 eventos con un citómetro de flujo Fortessa (BD LSR Fortessa).

6.13 Tamaño, peso y celularidad de Bazo

La evaluación sistémica consistió en la extracción del bazo del ratón después de la eutanasia. Una vez extraído mediante el uso de tijeras y pinzas estériles se procedió a tomar las medidas de tamaño en cm con un calibrador vernier digital marca: Steren / modelo: HER-411 y peso con balanza analítica digital marca: A&D / modelo: BM-20. Posterior a esto el bazo fue disgregado con ayuda de pinzas de disección hasta obtener una suspensión celular la cual fue tamizada con un tamizador celular marca Falcon de 70 μm . ref. 352350. Una vez obtenida la suspensión se cuantificó el número de esplenocitos a través del conteo manual con cámara de Neubauer.

6.14 Cuantificación de anticuerpos IgG anti *Nocardia brasiliensis* por ELISA

Se utilizaron placas de fondo plano (Costar) con 96 pozos en donde previamente se colocaron 0.5 g del antígeno P24 [106] por micropozo, disuelto en buffer de acetatos pH 5 e incubado a 4°C toda la noche. Posteriormente se realizaron 5 lavados con solución de PBS pH 7.2 y detergente Tween 20, 1:1,000. Posteriormente los pozos fueron bloqueados con una solución de leche descremada al 5% en PBS y se lavaron con la solución mencionada anteriormente. Los sueros de los ratones provenientes de los tres diferentes tratamientos fueron diluidos 1:500 y se incubaron a 37°C por una hora. Después se agregaron 200 μl de un conjugado comercial de peroxidasa con anti-inmunoglobulina G de ratón incubándose por una hora a 37°C. Se lavó de nuevo la placa y se agregó una mezcla de sustrato cromógeno compuesta de peróxido de hidrógeno y O-fenilendiamina (Sigma). Se realizó el paro de la reacción con ácido sulfúrico 1 N y la absorbancia se registró mediante un espectrofotómetro stat-fax 3200 a 492 nanómetros.

6.15 Cultivo de células cebadas y ensayos de viabilidad

Las células cebadas derivadas de médula ósea (BMMC) se diferenciaron siguiendo el protocolo descrito previamente [95]. En resumen, se aislaron progenitores de médula ósea del fémur y la tibia de ratones C57BL/6 hembra de 6 a 8 semanas de edad. Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 completo suplementado con 10 % de FBS, 5 mM de β -mercaptoetanol (Life Technologies, EE. UU.), 2 % de antibiótico (Sigma, EE. UU.), IL-3 recombinante murina (10 ng/mL) y factor de células madre recombinante murino (10 ng/mL; ambos factores de Peprotech, EE. UU.). Para promover el crecimiento selectivo

de células cebadas, las células no adherentes se transfirieron a medio fresco dos veces por semana durante 6 a 9 semanas. La pureza de las BMMC se confirmó mediante citometría de flujo, con ≥ 90 % de las células mostrando un fenotipo doblemente positivo para CD117 (c-Kit, clon 2B8, BioLegend) y FcεRI (clon MAR-1, BioLegend). Para los ensayos de viabilidad, se infectaron $2,5 \times 10^5$ BMMC/0,25 mL de medio completo con *N. brasiliensis* a MOI de 1:1, 10:1, 25:1 y 50:1 durante 24 h. Posteriormente, las células se lavaron y tiñeron con el colorante de viabilidad Zombie Green™ (BioLegend) siguiendo las instrucciones del fabricante y se fijaron con paraformaldehído al 2 %. Tras la tinción, se midió la viabilidad celular mediante citometría de flujo utilizando un citómetro FACS Aria Fusion (BD Biosciences, EE. UU.). Los datos se analizaron con el software FlowJo versión 6.0 (FlowJo, LLC). Se incluyó un control sin teñir para compensar la autofluorescencia.

6.16 Ensayo de degranulación

Las células cebadas derivados de médula ósea (BMMC, por sus siglas en inglés) se sembraron a una densidad de 2×10^5 células en 0.25 mL de amortiguador HEPES-Tyrode (HBT; composición: 130 mM NaCl, 5.5 mM glucosa, 2.7 mM KCl, 1.0 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1% (p/v) albúmina sérica bovina (BSA), 12 mM HEPES, 0.45 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 7.2). Las células se distribuyeron en los siguientes grupos experimentales: no estimuladas (control negativo), estimuladas con 10 µg/mL del compuesto 48/80 (control positivo), o estimuladas con *Nocardia brasiliensis* en multiplicidades de infección (MOI) de 0.5, 1 y 3. La incubación se realizó durante 90 minutos a 37 °C. Tras la estimulación, los sobrenadantes se recolectaron mediante centrifugación. El sedimento celular fue lisado posteriormente con 200 µL de Tritón X-100 al 0.2% en HBT. Para la cuantificación de la actividad de β-hexosaminidasa, tanto los sobrenadantes (enzima liberada) como los lisados celulares (enzima retenida) se incubaron con 1 mM de 4-metilumbeliferil N-acetil-β-D-glucosaminida (Sigma-Aldrich) en amortiguador de citrato sódico 200 mM (pH 4.5) durante 2 horas a 37 °C. La reacción enzimática se detuvo añadiendo 100 µL de Tris base 200 mM (pH 10.7). La fluorescencia se midió utilizando un espectrofluorímetro (SpectraMax M, EE. UU.) con una longitud de onda de excitación de 356 nm y emisión

de 450 nm. El porcentaje de liberación de β -hexosaminidasa se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Liberación} = [\text{Sobrenadante} / (\text{Sobrenadante} + \text{Sedimento celular})] \times 100$$

6.17 Cuantificación de citocinas inflamatorias mediante ELISA

Se analizaron las citocinas inflamatorias en los sobrenadantes de cultivo 24 h después de la infección con *N. brasiliensis*. Para el ensayo, se utilizaron $2,5 \times 10^5$ BMMC cultivadas en medio RPMI 1640 con *N. brasiliensis* a MOI de 0,5, 1,0 y 3,0. Las citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β se analizaron utilizando un kit ELISA comercial siguiendo las instrucciones del fabricante (BioLegend, San Diego, CA, EE. UU.). La absorbancia se midió con un fotómetro de microplacas Multiskan FC 357 (Thermo Fisher Scientific) y el software SkanIt v6.1.1.7.

6.18 Análisis estadístico

Se evaluó la normalidad de los datos a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnov, las comparaciones entre ambos grupos se analizaron mediante la prueba t para datos no pareados. Las comparaciones entre múltiples grupos fueron analizadas a través de la prueba de Kruskal-Wallis y el análisis de varianza para datos no paramétricos y paramétricos, respectivamente. La significación estadística se estableció con un valor $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 Las células cebadas son esenciales para la contención de *Nocardia brasiliensis* en actinomicetoma experimental.

En primer lugar, evaluamos la función de las células cebadas en la evolución clínica del micetoma experimental en ratones, un aspecto que no se había descrito previamente. Para ello, replicamos el modelo de actinomicetoma mediante inoculación subcutánea de bacterias [23] en ratones C57BL/6 Kit^{W-sh/W-sh} (Wsh), que tienen un déficit de células cebadas, y en ratones control (WT) de la misma camada. La tinción con azul de toluidina (TB) confirmó la reducción de células cebadas tisulares en los ratones Kit^{W-sh/W-sh} (Fig.4, panel B).

En los ratones control, las células cebadas se localizaban en la dermis y el tejido subcutáneo, rodeando el núcleo granulomatoso de las lesiones (Fig. 5). La progresión clínica del micetoma experimental no mostró diferencias en la infección temprana hasta el día 68 post-infección (DPI), momento en el que los ratones Kit^{W-sh/W-sh} presentaron lesiones más pequeñas, lo que sugiere indirectamente una menor inflamación tisular (Fig. 6, panel A). Se aisló y cultivó con éxito *Nocardia brasiliensis* viable a partir de las lesiones en ambos modelos. La tinción de Kinyoun confirmó el fenotipo bacteriano y la presencia de bacilos viables tanto en la fase temprana como en la tardía de la infección. Complementariamente al tamaño, las lesiones mostraron una mayor carga bacteriana en los ratones Kit^{W-sh/W-sh} durante la fase tardía de la infección, en comparación con los ratones control (Fig. 6, panel B). En conjunto, nuestros resultados indican que las células cebadas desempeñan un papel importante en el control de la infección por *Nocardia brasiliensis*, no durante la fase aguda, sino en la etapa crónica tardía de formación del micetoma.

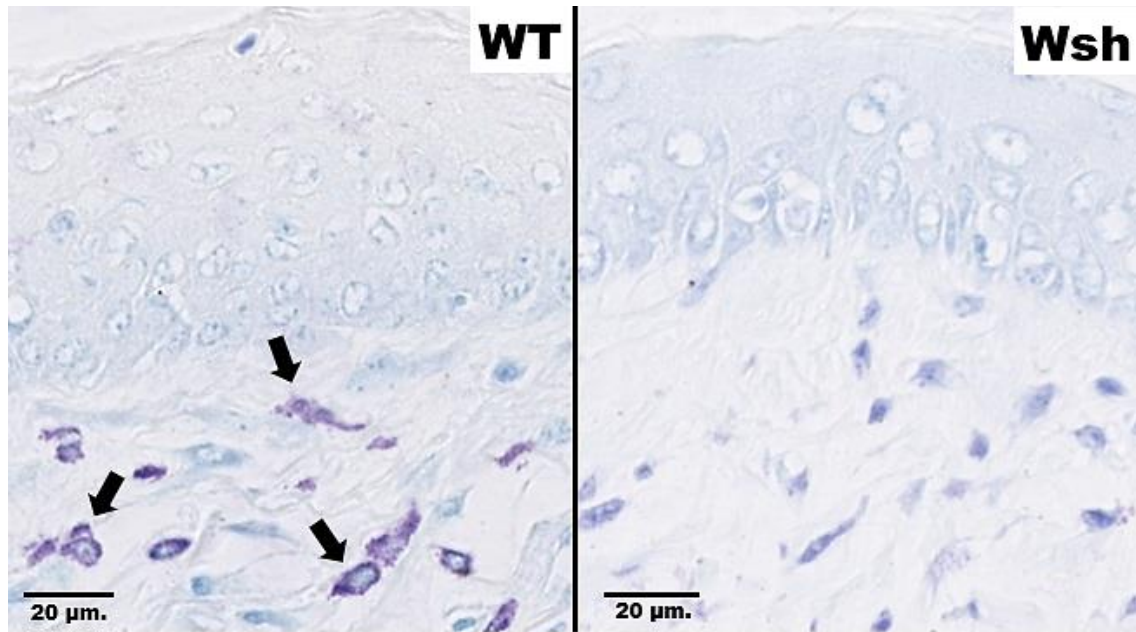


Figura. 4 Funcionalidad del modelo $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$. Los ratones Wsh (panel derecho) presentaron menos células cebadas que los ratones control WT (panel izquierdo). Las flechas indican la presencia de células cebadas positivas para azul de toluidina (TB).

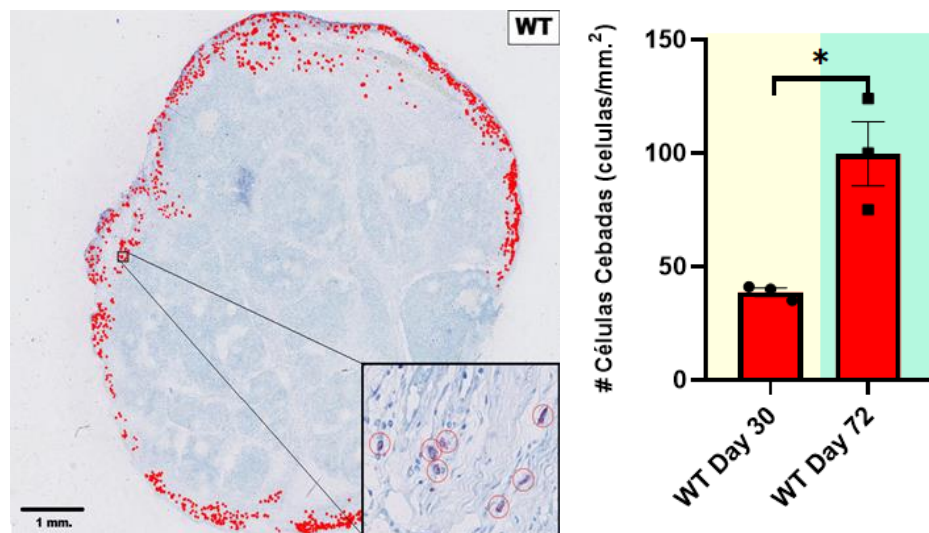


Figura. 5 Distribución de células cebadas en actinomietoma al día 72 posterior a infección. Las células cebadas se localizan en la dermis en ratones WT distribuidos de forma periférica al sitio de lesión en actinomietoma experimental al día 72 posterior a infección (el recuadro muestra células positivas para azul de toluidina con un círculo rojo). Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar de la media. Prueba t no pareada. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. N = 6 ratones.

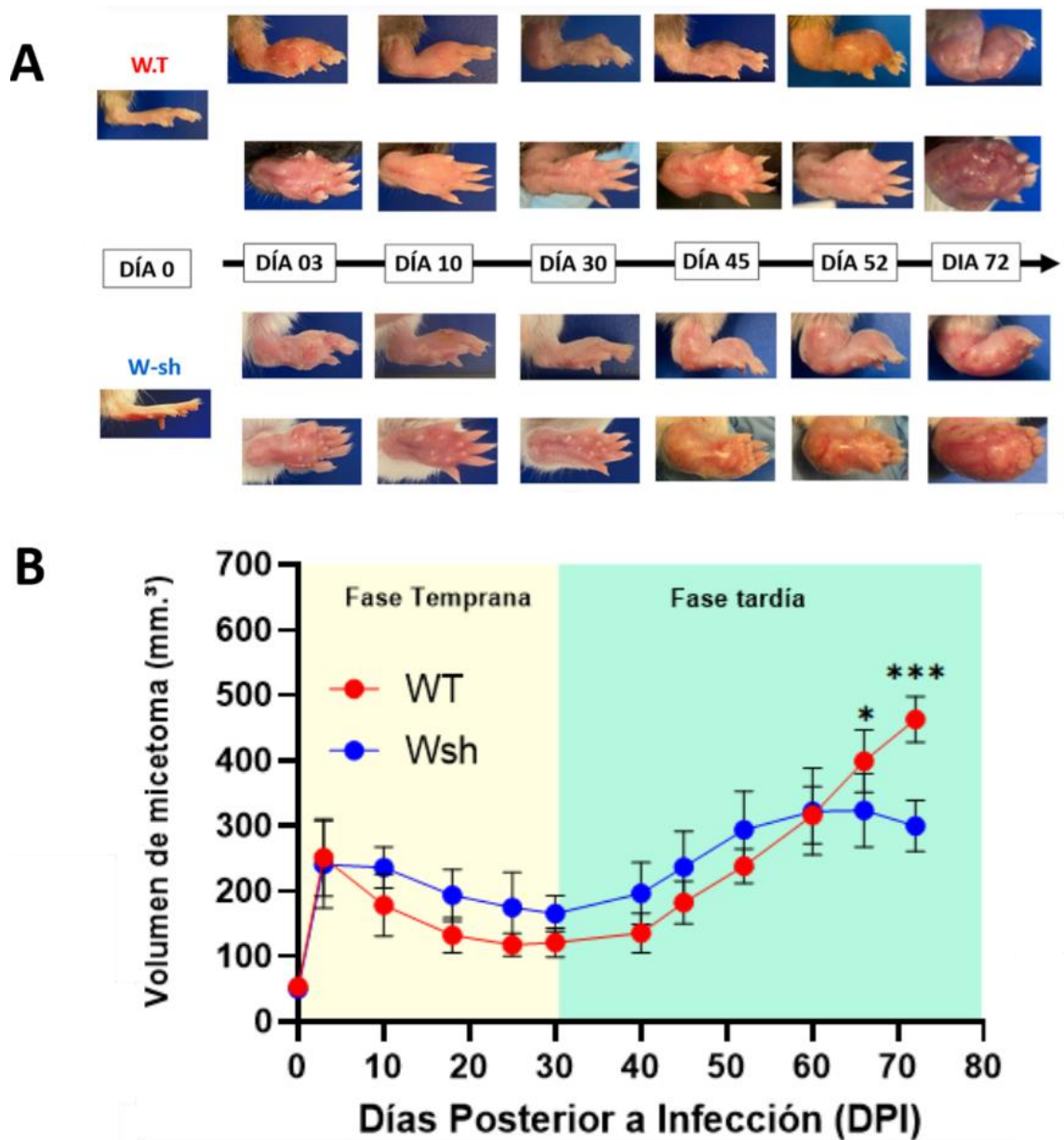


Figura. 6 Evolución clínica de la infección por *Nocardia brasiliensis*. (A). Imágenes representativas de la infección a lo largo del tiempo. (A). Imágenes representativas de la infección a lo largo del tiempo. (B) Los ratones Wsh mostraron una disminución del volumen del micetoma tras 72 días de infección por *Nocardia brasiliensis*. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías con medidas repetidas y un modelo de efectos mixtos (REML), seguido de la prueba post-hoc de Šídák. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ns, no significativo. $n = 6$ ratones por grupo. Cada experimento se realizó con al menos dos réplicas biológicas independientes.

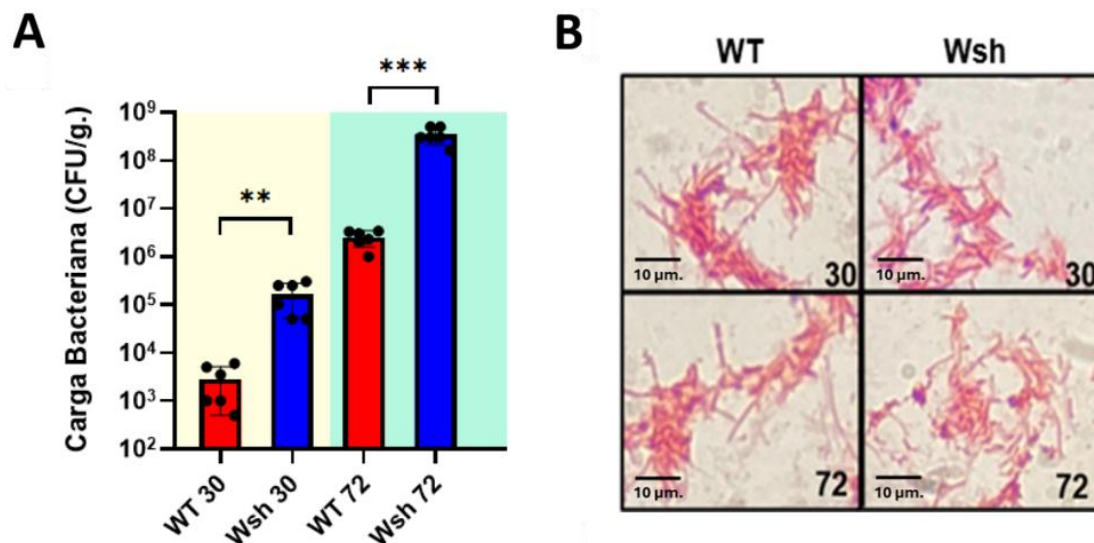


Figura. 7 Falla en el control de la carga bacteriana. (A) Las lesiones del micetoma en ratones Wsh presentaron una mayor carga bacteriana durante la infección temprana y tardía, en comparación con los ratones control. (B) La tinción de Kinyoun confirma la presencia del agente etiológico *Nocardia brasiliensis* en los mismos días posteriores a la infección (DPI) en ambos modelos de actinomictoma. Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar de la media. Prueba t no pareada. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. N = 3-6 ratones. UFC = Unidades Formadoras de Colonias.

7.2 Los granos bacterianos dentro del actinomictoma presentaron diferencias estructurales en ratones $\text{Kit}^{W-sh/W-sh}$ en comparación con los ratones control.

Además de los cambios en el volumen y la carga bacteriana, examinamos la distribución y las características morfológicas de los granos en ratones $\text{Kit}^{W-sh/W-sh}$ y control (Fig. 8, panel A). El número de granos bacterianos aumentó en los ratones $\text{Kit}^{W-sh/W-sh}$ en el DPI 30, estabilizándose posteriormente (Fig. 8, panel B). Por el contrario, el área promedio de los granos fue menor en los ratones $\text{Kit}^{W-sh/W-sh}$ que en los controles (Fig. 8, panel C). En general, la tendencia a un mayor número de granos bacterianos de menor tamaño sugiere una maduración anormal de las microcolonias bacterianas y cierta dificultad para establecer una infección robusta.

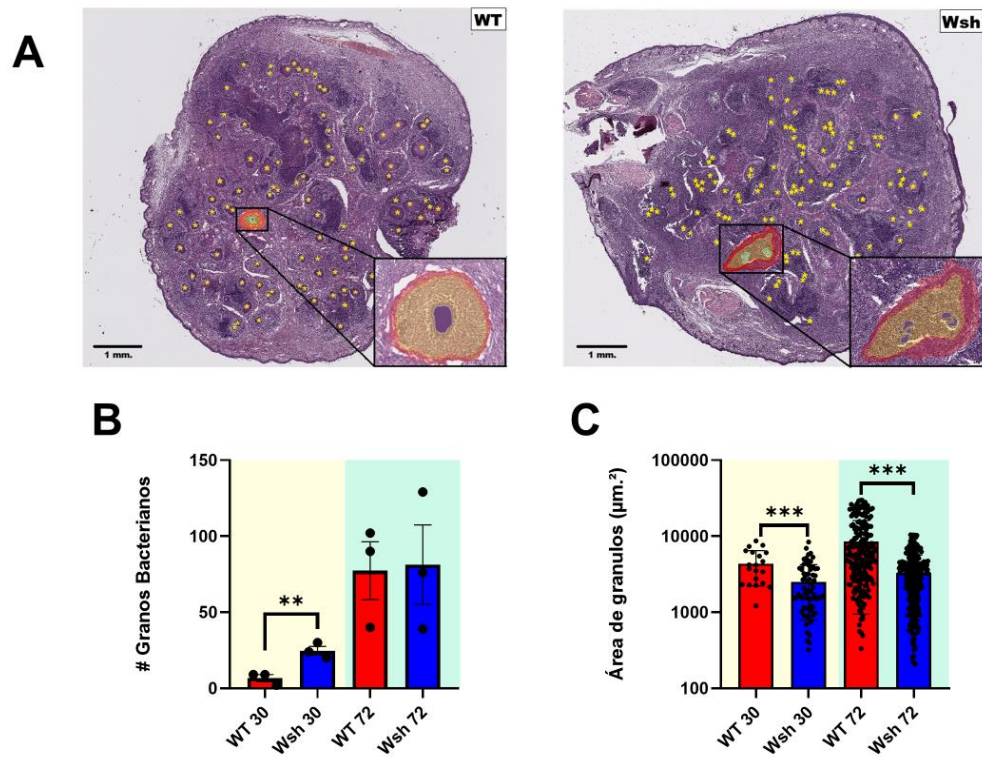


Figura. 8 Morfometría de los gránulos de *Nocardia brasiliensis*. El micetoma en ratones Wsh mostró cambios morfológicos en la estructura del grano bacteriano en comparación con los ratones control. (A) Lesiones completas del micetoma que muestran la distribución de granos individuales (puntos amarillos) en ratones control (panel izquierdo) y Wsh (panel derecho). Los insertos muestran la estructura típica del granuloma: un grano central rodeado de infiltrados de células polimorfonucleares (máscara amarilla) y un anillo fibrótico (tejido de color rojo). Micetoma a los 72 días después de la infección. Tinción con hematoxilina y eosina. (B) Las lesiones del micetoma en ratones Wsh tuvieron un mayor número de (C) granos bacterianos más pequeños en comparación con los de los ratones control. Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar de la media. Prueba t no pareada. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. N = 3-6 ratones.

El análisis histopatológico comparativo entre ratones $\text{Kit}^{W-sh/W-sh}$ se realizó clasificando los hallazgos de acuerdo con los criterios establecidos por Shackelford y colaboradores en 2002 [107] para lesiones no neoplásicas en modelos murinos. La severidad de los hallazgos se determinó mediante un análisis semicuantitativo empleando una escala de cruces: (+) leve, (++) moderado y (+++) grave, lo que permitió una evaluación sistemática

y reproducible de los cambios tisulares. A los 30 días post-infección (DPI), los ratones $\text{Kit}^{W^{-sh}/W^{-sh}}$ (cruces en azul) mostraron una mayor severidad en diversos hallazgos en comparación con los ratones WT (cruces en rojo). En cuanto a los cambios histopatológicos, los ratones deficientes en células cebadas presentaron mayor edema, necrosis, congestión vascular, panniculitis e inflamación perineural más acentuadas, así como una mayor formación de microabscesos y gránulos bacterianos. Con respecto a los hallazgos celulares, se observó un infiltrado inflamatorio más pronunciado, así como una mayor presencia de células espumosas y células gigantes multinucleadas en los ratones $\text{Kit}^{W^{-sh}/W^{-sh}}$ en comparación con los WT. Estas diferencias indican que, en ausencia de células cebadas, la respuesta inflamatoria en la fase temprana es más exacerbada y menos organizada, con una mayor formación de microabscesos y persistencia bacteriana. Sin embargo, a los 72 DPI, los hallazgos histopatológicos y celulares entre ambos grupos se nivelaron, observándose una severidad comparable en la mayoría de los parámetros evaluados, lo que sugiere que, aunque las células cebadas son cruciales para la organización temprana del granuloma, otros mecanismos compensatorios podrían estar operando en etapas más avanzadas de la infección.

Tabla 7 Análisis histopatológico y celular comparativo en lesiones de actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* en ratones WT y Kit^{W-sh/W-sh}. Las tablas resumen la severidad de los hallazgos en cortes de tejido infectado teñidos con hematoxilina y eosina, evaluados a los 30 y 72 DPI. La severidad se representa mediante una escala de cruces: (+) leve, (++) moderado y (+++) grave. Las cruces en rojo corresponden a WT y en azul a Kit^{W-sh/W-sh}. n = 6 ratones por grupo.

Cambios histopatológicos	WT 30	Wsh 30	WT 72	Wsh 72	CSI WT
PMN	+++	+++	+++	+++	-
LINFOCITOS	++	+	+	+	+
PLASMÁTICAS	++	++	+	+	-
EOSINÓFILOS	+	+	+	+	-
CEBADAS	+	++	+	+	+
ESPUMOSAS	++	+++	++	++	-
FIBROBLASTOS	++	++	++	++	-
EDEMA	++	+++	++	++	-
CONGESTION VASCULAR	+	++	+	+	-
NECROSIS	+	++	+++	+++	-
PANICULITIS	++	+++	++	+++	-

Tabla 7. Análisis histopatológico y celular comparativo en lesiones de actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* en ratones WT y Kit^{W-sh/W-sh}. Las tablas resumen la severidad de los hallazgos en cortes de tejido infectado teñidos con hematoxilina y eosina, evaluados a los 30 y 72 DPI. La severidad se representa mediante una escala de cruces: (+) leve, (++) moderado y (+++) grave. Las cruces en rojo corresponden a WT y en azul a Kit^{W-sh/W-sh}. n = 6 ratones por grupo.

Cambios histopatológicos	WT 30	Wsh 30	WT 72	Wsh 72	CSI WT
INFLAMACIÓN PERINEURAL	+	++	++	++	-
NEURITIS	-	-	-	-	-
OSTEOMIELITIS AGUDA	+	+	+++	+++	-
VASCULITIS	-	-	-	-	-
TROMBOS SÉPTICOS	-	-	-	-	-
HIPERPLASIA LINFOIDE	+	-	+	-	-
ULCERACIÓN	-	-	-	-	-
MICROABSCESOS	+	++	+++	+++	-
BACTERIA	++	+++	++	+++	-
MIOSITIS	++	++	++	++	-
ATROFIA	+	+	-	+	-

7.3 El micetoma experimental en ratones Kit^{W-sh/W-sh} mostró una menor infiltración leucocitaria, acompañada de un mayor tamaño esplénico en comparación con los ratones control.

A continuación, cuantificamos la celularidad leucocitaria dentro de la lesión activa y otros parámetros para identificar cambios sistémicos asociados al micetoma clínico en ausencia de células cebadas. Los leucocitos infiltrantes se evaluaron mediante citometría de flujo tras la digestión enzimática de las lesiones activas (Fig. 9, panel A). El micetoma en ratones Kit^{W-sh/W-sh} mostró una disminución transitoria en el porcentaje de neutrófilos Ly6G/6C⁺ durante la infección temprana, aunque esto no alteró el predominio absoluto de neutrófilos entre los leucocitos infiltrantes (Fig. 9, panel B). Asimismo, el micetoma en estos ratones presentó un porcentaje menor de linfocitos infiltrantes CD3 ~ que en los controles (Fig. 9, panel C). Entre los cambios sistémicos, se observó un aumento del peso y tamaño del bazo en los ratones Kit^{W-sh/W-sh} en comparación con los controles (Fig. 9, panel D). Al examinar la respuesta humoral adaptativa mediante los niveles de IgG anti-*Nocardia* circulantes, encontramos niveles similares en ambos grupos (Fig. 9, panel E). En conjunto, la reducción de linfocitos infiltrantes junto con la esplenomegalia asociada podría indicar un estado inflamatorio disociado entre la lesión local y los signos de inflamación sistémica.

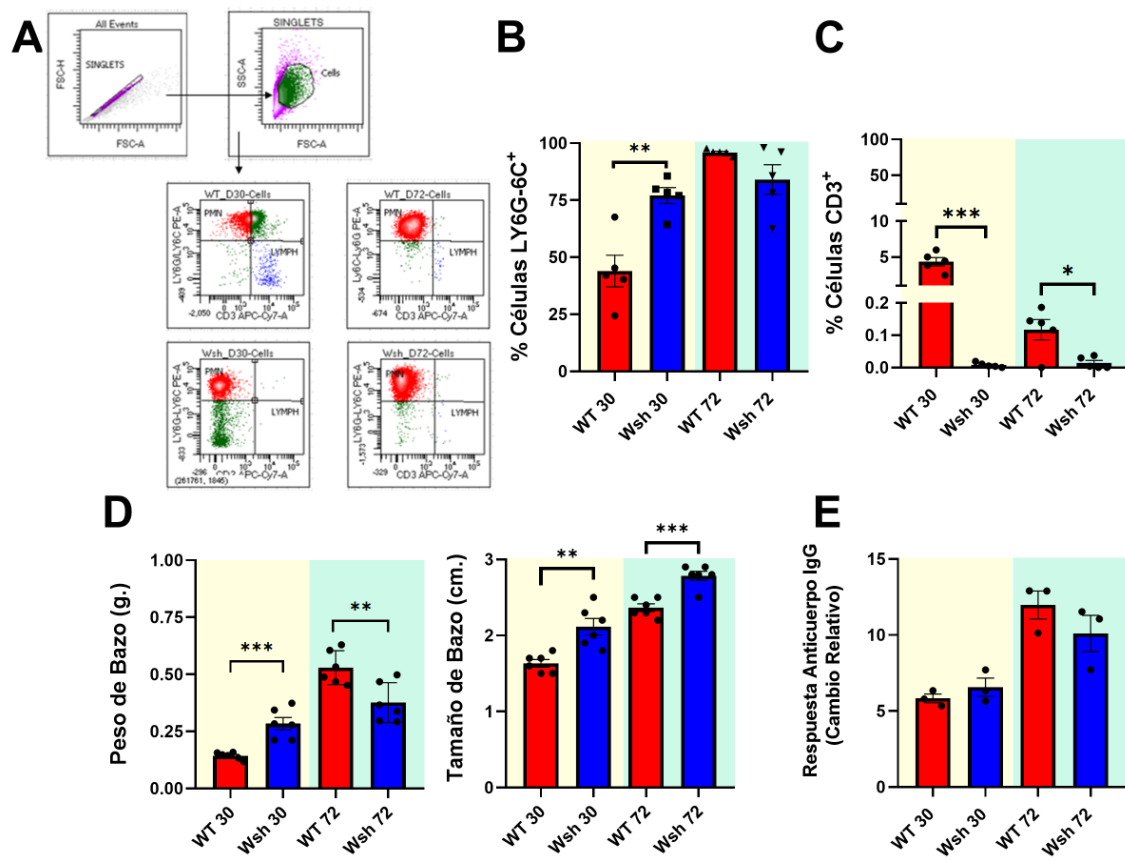


Figura. 9 Infiltración leucocitaria en actinomietoma al día 72 posterior a infección.

Los ratones Wsh mostraron una disminución de la infiltración leucocitaria y un aumento del tamaño esplénico después de un mictoma experimental con *Nocardia brasiliensis*. (A) Los diagramas de flujo representativos de la infiltración leucocitaria en el mictoma muestran un predominio de polimorfonucleares Ly6G/6C+. (B) El mictoma en ratones Wsh mostró una ventaja numérica inicial en células polimorfonucleares a los 30 DPI, seguida de una incapacidad para mantener esta respuesta a los 72 DPI, mientras que los ratones de control exhibieron una infiltración sostenida a lo largo del tiempo. (C) El mictoma en ratones Wsh mostró menos linfocitos en comparación con los ratones control en los mismos días posteriores a la infección. Entre los cambios sistémicos, los ratones Wsh mostraron (D) un aumento del peso (panel izquierdo) y del tamaño (panel derecho) del bazo, pero (E) títulos similares en la respuesta de anticuerpos a *Nocardia brasiliensis* en relación con los ratones de control. Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar de la media. Prueba t no pareada. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. N = 3-6 ratones. Cambio en relación con los compañeros de camada no infectados.

7.4 Activación inflamatoria de células cebadas derivados de médula ósea (BMMC) tras la infección *in vitro* con *Nocardia brasiliensis*

Tras observar que las células cebadas desempeñan un papel relevante en el modelo experimental, decidimos evaluar si son capaces por sí solos de reconocer y activarse en

respuesta a *Nocardia brasiliensis*. Para ello, se infectaron células cebadas derivadas de médula ósea (BMMC) con la bacteria *in vitro*. Como se muestra en la Fig. 10, panel A, las bacterias establecieron un contacto estrecho con la membrana plasmática de las células cebadas, formando agregados. Basándonos en trabajos previos, utilizamos una multiplicidad de infección (MOI) de 3 [8]. Buscamos entonces determinar si este contacto directo conducía a una activación efectiva, evaluando el nivel de desgranulación de los BMMC tras la infección. Cuantificamos la liberación de β -hexosaminidasa, un marcador clásico de exocitosis de gránulos de células cebadas en los sobrenadantes de cultivo. La infección con *Nocardia brasiliensis* a un MOI de 3 indujo una desgranulación significativa en comparación con las células no estimuladas (control basal). Esta liberación de β -hexosaminidasa fue dependiente de la dosis, siendo mayor con MOI 3 que con MOI 1 (Fig. 10, panel B). Estos resultados demuestran que *Nocardia brasiliensis* no solo contacta físicamente con las células cebadas, sino que es un estímulo suficiente para desencadenar su respuesta secretora.

Posteriormente, analizamos el efecto de la infección *in vitro* sobre la síntesis de citocinas inflamatorias por los BMMC. Encontramos niveles elevados de TNF- α e IL-6 para MOIs entre 0.5 y 3. En contraste, la IL-1 β solo fue detectable con un MOI de 3 (Fig. 10, paneles C, D, E). En conjunto, estos resultados sugieren que las células cebadas pueden activarse directamente por *Nocardia brasiliensis*, principalmente mediante la detección de patrones moleculares asociados a bacterias, lo que induce la liberación de diversos mediadores inflamatorios.

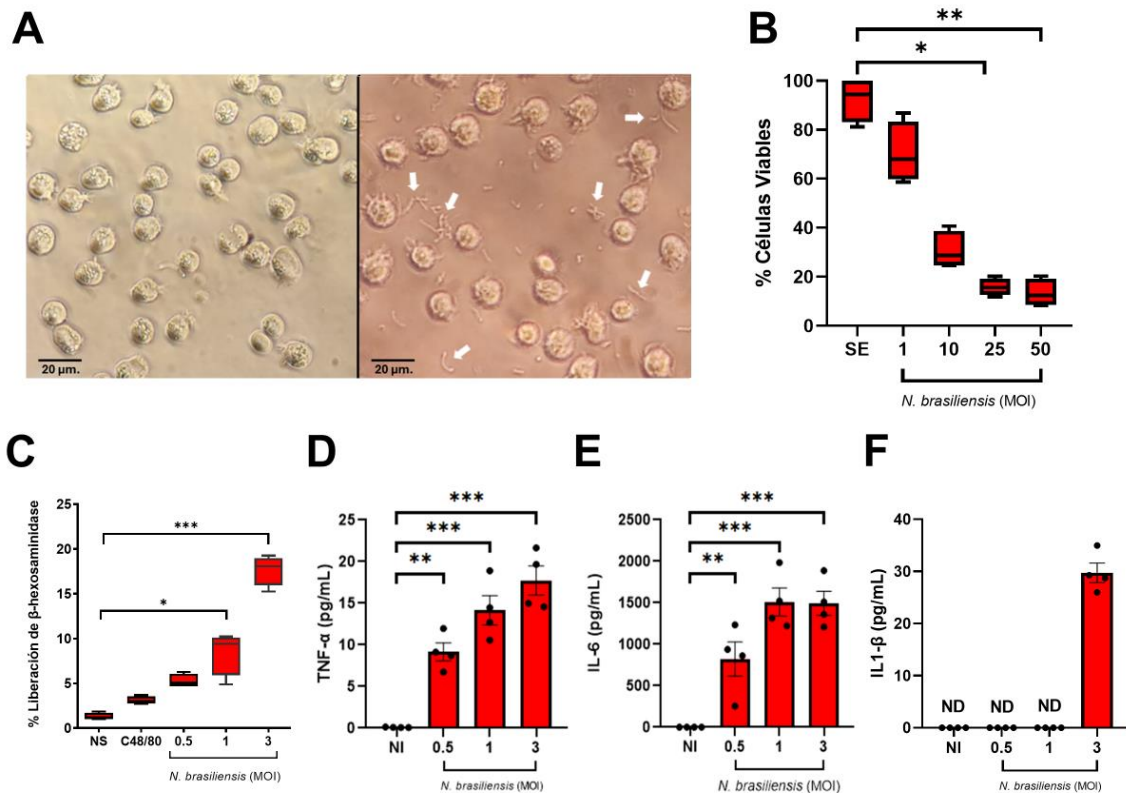


Figura. 10 Síntesis de mediadores proinflamatorios en células cebadas derivadas de médula ósea (BMMC) por infección in vitro con *Nocardia brasiliensis*. (A) Micrografías representativas (x100) de cultivos de células cebadas infectadas (panel derecho) y control (panel izquierdo). Las flechas indican bacterias extracelulares. (B) Porcentaje de viabilidad de los BMMC tras la infección in vitro con *Nocardia brasiliensis*. (C) Activación de BMMC por *Nocardia brasiliensis* a través del ensayo de beta hexosaminidasa. Aumentó la síntesis de TNF-α (D), IL-6 (E) e IL-1β (F) en los BMMC cultivados. Los datos se presentan como mediana ± rango intercuartil (B) y media ± error estándar (C-E). Se utilizaron las pruebas de Kruskal-Wallis (B) y ANOVA (C-E). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. N = 4 ratones, NI = Sin infección.

8. DISCUSIÓN

El papel de las células cebadas en infecciones bacterianas está cada vez más establecido. Sin embargo, en la infección por *Nocardia brasiliensis* no se ha explorado, por lo que resulta de considerable interés describir su participación en este contexto. Para ello, empleamos un modelo deficiente en células cebadas, el ratón Kit^{W-sh/W-sh}, en el que replicamos la infección por actinomicetoma. Como ocurre con cualquier modelo genético,

la interpretación de los resultados requiere una consideración cuidadosa de sus limitaciones inherentes. No obstante, a diferencia de otras cepas mutantes clásicas de Kit (por ejemplo, Kit^{W-sh/W-sh}), los ratones Kit^{W-sh/W-sh} no son anémicos ni estériles, y mantienen una hematopoyesis mayoritariamente normal y competente [99]. Estos atributos subrayan por qué el ratón Kit^{W-sh/W-sh} sigue siendo una herramienta valiosa y ampliamente utilizada para el análisis funcional de las células cebadas *in vivo*.

En primera instancia, la distribución de las células cebadas en ratones controles (WT) se observó localizada estratégicamente en la periferia de los granulomas (Fig. 5). Su número aumentó significativamente desde la fase temprana (30 DPI) hasta la fase crónica (72 DPI), lo que indica una posible participación activa en la inflamación sostenida. Este patrón de localización periférica y expansión se ha observado en granulomas inducidos por *Mycobacterium tuberculosis* [96], y se encontró una acumulación de células cebadas en la periferia de los granulomas durante la infección crónica sin infiltrar el núcleo necrótico [85].

Como una medida indirecta de inflamación, evaluamos el volumen de la lesión en el modelo Kit^{W-sh/W-sh}, como se ha reportado por Salinas-Carmona y colaboradores en 1999 [23]. Observamos una disminución de la inflamación en la etapa crónica de la infección, acompañada de un aumento de la carga bacteriana (Fig. 6). Estos resultados concuerdan con modelos de infección de TB pulmonar que usaron ratones Kit^{W-sh/W-sh}, donde se demostró un aumento de la carga bacteriana en bazo y pulmón en etapas crónicas respecto al grupo control, a pesar de tener una ruta de infección diferente y realizar los ensayos de sacrificio y análisis en tiempos distintos [74].

La infección crónica por *Nocardia brasiliensis* induce la formación de estructuras granulomatosas que contribuyen a limitar el crecimiento bacteriano y la diseminación de la infección. En este trabajo se observaron diferencias en la estructura y el número de granos en ratones Kit^{W-sh/W-sh} en comparación con los ratones control. Este defecto en la organización del granuloma y en el control bacteriano en ratones deficientes en células cebadas también se ha observado en modelos de TBP, donde los ratones Kit^{W-sh/W-sh} exhibieron un área reducida de granulomas por *Mycobacterium tuberculosis* y un aumento

de la carga bacteriana tanto en pulmón como en bazo a los 14, 28 y 60 días post-infección [74]. Sugerimos que la deficiencia de células cebadas altera la organización del granuloma. Aunque se formaron focos infecciosos en ratones $\text{Kit}^{W-sh/W-sh}$, estos no progresaron hacia una estructura organizada. En conjunto, estos datos respaldan la hipótesis de que las células cebadas son esenciales para una respuesta granulomatosa eficaz contra *Nocardia brasiliensis*. Esta función parece análoga a su papel en otras enfermedades granulomatosas por *Mycobacterium tuberculosis* [83]. En ese modelo micobacteriano, se demostró que la transferencia adoptiva de células cebadas corrige la susceptibilidad a la infección del huésped, mejora el control bacteriano y normaliza el reclutamiento de células mieloides, demostrando directamente su importancia en la formación de la arquitectura del granuloma [83]. Esto posiciona a las células cebadas como un puente crítico entre la defensa inmunitaria aguda y la patología tisular crónica, con un papel clave paralelo en procesos de remodelación tisular como la fibrosis y la angiogénesis [108, 109, 110, 111].

La infección crónica por especies de *Nocardia* afecta la inmunidad sistémica, como sugieren los trabajos de Welsh y colaboradores en 2007, quienes resaltaron el papel de los macrófagos y linfocitos infiltrados en el control de la infección en ratones BALB/c [8].

En el modelo de ratones $\text{Kit}^{W-sh/W-sh}$, se evaluó el reclutamiento de células mieloides (Ly6G/6C^+) en el tejido infectado y se encontró un aumento significativo respecto al grupo control a los 30 DPI; sin embargo, a los 72 DPI esta diferencia no se mantuvo (Fig. 9). El aumento transitorio de las células Ly6G/6C^+ podría explicarse por las características propias del modelo $\text{Kit}^{W-sh/W-sh}$, como la mielopoyesis extramedular aberrante y la neutrofilia basal características de esta cepa [101]. También observamos un déficit de linfocitos T CD3^+ , que constituyeron menos del 5% de las células en la lesión. Este hallazgo concuerda con lo publicado por Vázquez-Marmolejo y Ruiz de la Cruz en 2025, quienes reportaron que en la infección crónica por *Nocardia brasiliensis* los leucocitos predominantes a nivel local en tejido infectado son los neutrófilos, mientras que los linfocitos T disminuyen considerablemente en el tejido infectado [31,32]. Sin embargo, la disminución significativa en el número de CD3^+ observado en nuestros experimentos probablemente se atribuya a la deficiencia de células cebadas en el ratón $\text{Kit}^{W-sh/W-sh}$.

Los ratones $\text{Kit}^{W-sh/W-sh}$ tuvieron un mayor número de esplenocitos a los 30 DPI, pero fueron superados por los ratones WT a los 72 DPI (Fig. 9 panel D), lo que sugiere una alteración transitoria y refuerza la existencia de una ventaja numérica inicial explicada por la mielopoyesis extramedular aberrante y la neutrofilia basal características de esta cepa [101], que no se mantiene en el tiempo en ausencia de células cebadas [112]. Esto subraya la existencia de un "período crítico" al inicio de la infección, durante el cual una alteración en el mantenimiento constante de este linaje celular compromete la posterior organización estructural y funcional del granuloma [83,113]. Los resultados sugieren que las células cebadas podrían dirigir el reclutamiento sostenido de células mieloides.

Respecto a los efectos sistémicos, medidos como peso y tamaño del bazo (Fig. 9D) [112], así como la producción de anticuerpos IgG anti-*Nocardia* intacta sin diferencias significativas entre ratones $\text{Kit}^{W-sh/W-sh}$ y WT (Fig. 9 panel E), los resultados sugieren que la respuesta adaptativa humoral permanece funcional, mientras que el impacto de la deficiencia de células cebadas parece tener efecto en la inmunidad celular. El análisis del reclutamiento de células mieloides (Ly6G/6C^+) a los 30 DPI en ratones $\text{Kit}^{W-sh/W-sh}$ reveló una anomalía en el reclutamiento mielóide al día 30 posterior a la infección (Fig. 9). Este hallazgo es crucial porque, en el granuloma por *Nocardia brasiliensis*, las células mieloides, particularmente los neutrófilos (Ly6G^+), son componentes estructurales que constituyen los microabscesos centrales característicos de su arquitectura supurativa [32]. Notablemente, los ratones $\text{Kit}^{W-sh/W-sh}$ exhibieron una ventaja numérica en células mieloides en tiempos tempranos (30 DPI) en comparación con los controles WT. Esta ventaja inicial podría explicarse por la mielopoyesis extramedular aberrante y la neutrofilia basal características de esta cepa [101], quienes demostraron que los ratones $\text{Kit}^{W-sh/W-sh}$ tienen frecuencias aumentadas de células mieloides CD11b^+ y neutrófilos en condiciones basales. Sin embargo, a pesar de esta ventaja numérica, se logró un granuloma desorganizado y, en la fase tardía (72 DPI), los ratones WT superaron a los ratones $\text{Kit}^{W-sh/W-sh}$ en el número de células mieloides, lo que indica una alteración en el mantenimiento de la respuesta mielóide en las etapas crónicas de la infección.

Los ratones $\text{Kit}^{W-sh/W-sh}$ tuvieron un mayor número de esplenocitos a los 30 DPI, pero fueron superados por los ratones WT a los 72 DPI, lo que sugiere una alteración esplénica

donde se observó un patrón similar al del infiltrado mieloide, probablemente explicado por la mielopoyesis extramedular aberrante y la neutrofilia basal características de esta cepa [101], que no se mantiene en el tiempo en ausencia de células cebadas [112]. Esto subraya la existencia de un "período crítico" al inicio de la infección, durante el cual la falta del mantenimiento constante compromete la posterior maduración estructural y funcional del granuloma [83,113]. Los resultados indican que las células cebadas podrían dirigir este reclutamiento sostenido de células mieloides.

En cuanto al déficit de linfocitos CD3⁺ reclutados nuestros resultados muestran un porcentaje de menos del 5% al día 30 posterior a infección con una disminución de hasta el 0.1 % al día 70 posterior a infección en el sitio de la lesión. Esto concuerda con lo publicado por Ruiz de la Cruz, donde observaron que los linfocitos T CD3⁺ representaban únicamente un pequeño porcentaje del total de eventos registrados en el tejido infectado (0.58% a los 70 DPI, 1.17% a los 100 DPI y 2.86% a los 365 DPI), y que, dentro de esta población, los linfocitos CD4⁺ eran los predominantes, constituyendo más del 70% de las células T en la lesión en todos los tiempos evaluados [32]. A pesar del número bajo de linfocitos T CD3⁺, estudios previos de nuestro grupo han documentado la presencia de células Th1 en el microambiente del actinomicetoma [114] así como una subpoblación Th17 [26]. Así pues, en el contexto de nocardiosis, la ausencia de señales tempranas derivadas de las células cebadas afecta a las células Ly6G⁺ y a los linfocitos T CD3⁺, lo que probablemente conduce a una desregulación de la respuesta inmunitaria típica en este modelo [26].

Respecto a los efectos sistémicos, medidos como alteración esplénica (Fig. 9D) [112], aunado a una producción de anticuerpos IgG anti-*Nocardia* sin diferencias significativas entre ratones Kit^{W-sh/W-sh} y WT (Fig. 9 panel E), sugieren que la respuesta adaptativa humoral permanece funcional, mientras que el impacto de la deficiencia de células cebadas parece tener efecto en la inmunidad celular.

En este trabajo comprobamos que las células cebadas reconocen a *Nocardia brasiliensis* en la infección *in vitro*; las cuales liberan β -hexosaminidasa (Fig. 10), un marcador clásico de degranulación de las células cebadas, y responden a la infección mediante la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Estos resultados

concuerdan parcialmente con los hallazgos de Soria-Castro y colaboradores en 2021, quienes describen que las células cebadas infectadas *in vitro* por *Listeria monocytogenes* (bacteria intracelular) se activan a través de la producción de β -hexosaminidasa y ROS. También demuestran que *L. monocytogenes* induce la síntesis *de novo* de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β [73]. Si bien la producción de citocinas es indicativa de activación, nuestros datos demuestran que *Nocardia brasiliensis* también induce potencialmente la degranulación, un mecanismo efector por excelencia de las células cebadas. La inducción concomitante de citocinas tempranas (IL-6, TNF- α) y la liberación tardía de IL-1 β , dependiente de una alta carga bacteriana, indica que *Nocardia brasiliensis* provoca una respuesta bifásica en las células cebadas, que abarca tanto la fase inmediata (degranulación) como la fase retardada (síntesis de citocinas).

Los hallazgos de nuestro estudio, que demuestran una liberación robusta de IL-6, TNF- α e IL-1 β tras la activación de las células cebadas, se alinean con los mecanismos establecidos de reclutamiento de neutrófilos y activación antimicrobiana en infecciones murinas. La señalización a través de IL-1R es esencial para el reclutamiento de neutrófilos en infecciones cutáneas por *Staphylococcus aureus* [115]. El TNF- α no solo promueve la adhesión endotelial a través de ICAM-1, sino que también mejora las funciones efectoras antimicrobianas de los neutrófilos, como la producción de especies reactivas de oxígeno, la liberación de enzimas granulares y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), que son cruciales para la eliminación de patógenos [116,117]. Mientras tanto, la IL-6 regula la magnitud del tráfico de neutrófilos mediante la modulación de quimiocinas como CXCL1/KC a través de la vía STAT3 [118]. Por lo tanto, la tríada de citocinas liberadas por las células cebadas activadas constituye una firma proinflamatoria que puede dirigir el reclutamiento de neutrófilos y la activación antimicrobiana.

Nuestros datos establecen que las células cebadas reconocen a *Nocardia brasiliensis* y que no son meramente sensores de la infección, sino que son importantes para que se produzca la respuesta granulomatosa supurativa característica del actinomicetoma. Esto posiciona a las células cebadas como un eje fundamental que conecta la defensa inmunitaria innata, la inmunidad adaptativa y la patología tisular crónica en el actinomicetoma.

9. CONCLUSIÓN

Nocardia brasiliensis desencadena la activación de células cebadas, las cuales ejercen funciones efectoras clave en la estructuración del granuloma y en la restricción de la diseminación bacteriana, consolidando así su papel como mediadores activos de la inmunidad protectora en el actinomicetoma experimental.

10. REFERENCIAS:

1. Hao X, Cognetti M, Burch-Smith R, Mejia EO, Mirkin G. Mycetoma: Development of Diagnosis and Treatment. *J Fungi*. Basel, Switzerland; 2022 July 19;8(7):743. doi: 10.3390/jof8070743PubMed PMID: 35887499; PMCID: PMC9323607
2. Arenas Guzman R. *Micología médica ilustrada*, 5e [Internet]. 5a.ed. México: MCGraw-Hill, 2014.; 2014.
3. Verma P, Jha A. Mycetoma: reviewing a neglected disease. *Clin Exp Dermatol*. 2019 Mar;44(2):123–9. doi: 10.1111/ced.13642PubMed PMID: 29808607
4. Salah ME, Fearon Scales ML, Habib K, Alhamwi F, Abdelwahab S, Ahmed Y, Khalid MM, Smith DJ, Fahal A. Global sociodemographic, clinical, and epidemiological profiling of patients with mycetoma: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2025 Aug;19(8):e0013217. doi: 10.1371/journal.pntd.0013217PubMed PMID: 40811735; PMCID: PMC12617881
5. Zhu F, Tan C, Li C, Ma S, Wen H, Yang H, Rao M, Zhang P, Peng W, Cui Y, Chen J, Pan P. Design of a multi-epitope vaccine against six *Nocardia* species based on reverse vaccinology combined with immunoinformatics. *Front Immunol*. 2023;14:1100188. doi: 10.3389/fimmu.2023.1100188PubMed PMID: 36845087; PMCID: PMC9952739
6. Salinas-Carmona MC. *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. *Microbes Infect*. 2000 Sept;2(11):1373–81. doi: 10.1016/s1286-4579(00)01291-0PubMed PMID: 11018454
7. 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;8(8):e3102. doi: 10.1371/journal.pntd.0003102PubMed PMID: 25144462; PMCID: PMC4140667
8. Welsh O, Vera-Cabrera L, Salinas-Carmona MC. Mycetoma. *Clin Dermatol*. 2007 Mar 1;25(2):195–202. doi: 10.1016/j.clindermatol.2006.05.011
9. 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;149(5):586–92. PubMed PMID: 24108347
10. Develoux M, Ndiaye B, Dieng MT. [Mycetomas in Africa]. *Sante*. Montrouge, France; 1995;5(4):211–7. PubMed PMID: 7582641
11. López Martínez R, Méndez Tovar LJ, Lavalle P, Welsh O, Saúl A, Macotella Ruíz E. [Epidemiology of mycetoma in Mexico: study of 2105 cases]. *Gac Med Mex*. 1992;128(4):477–81. PubMed PMID: 1308000

12. Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki K ichiro, Ludwig W, Whitman WB, editors. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* [Internet]. New York, NY: Springer; 2012.
13. Butler WR, Kilburn JO, Kubica GP. High-performance liquid chromatography analysis of mycolic acids as an aid in laboratory identification of *Rhodococcus* and *Nocardia* species. *J Clin Microbiol*. 1987 Nov;25(11):2126–31. doi: 10.1128/jcm.25.11.2126-2131.1987PubMed PMID: 3693543; PMCID: PMC269425
14. LECHEVALIER MP, LECHEVALIER H. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Evol Microbiol. Microbiology Society*,; 1970;20(4):435–43. doi: 10.1099/00207713-20-4-435
15. Lechevalier MP, De Bievre C, Lechevalier H. Chemotaxonomy of aerobic Actinomycetes: Phospholipid composition. *Biochem Syst Ecol*. 1977 Jan 1;5(4):249–60. doi: 10.1016/0305-1978(77)90021-7
16. Yamada Y, Ishikawa T, Tahara Y, Kondo K. The Menaquinone System in the Classification of the Genus *Nocardia*. *J Gen Appl Microbiol*. 1977;23(5):207–16. doi: 10.2323/jgam.23.207
17. Kumagai K, Taya K, Fukui A, Fukasawa M, Fukui M, Nabeshima S. PC-766B, a new macrolide antibiotic produced by *Nocardia brasiliensis*. I. Taxonomy, fermentation and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)*. 1993 June;46(6):972–8. doi: 10.7164/antibiotics.46.972PubMed PMID: 8393851
18. Salinas-Carmona MC, Rocha-Pizaña MR. Construction of a *Nocardia brasiliensis* fluorescent plasmid to study Actinomycetoma pathogenicity. *Plasmid*. 2011 Jan 1;65(1):25–31. doi: 10.1016/j.plasmid.2010.09.005
19. Cherry J, Kaplan SL, Demmler-Harrison GJ, Steinbach W, Hotez PJ, Williams JV. Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases - E-Book: 2-Volume Set. Elsevier Health Sciences; 2024.
20. Mangieri NA, Guevara Nuñez D, Echavarría G, Bertona E, Castello L, Benchetrit G, De Paulis AN. [Sporotrichoid nocardiosis by *Nocardia brasiliensis*]. *Rev Argent Microbiol*. 2021;53(1):43–7. doi: 10.1016/j.ram.2020.06.007PubMed PMID: 32739070
21. Gao B, Paramanathan R, Gupta RS. Signature proteins that are distinctive characteristics of Actinobacteria and their subgroups. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2006 July;90(1):69–91. doi: 10.1007/s10482-006-9061-2PubMed PMID: 16670965
22. Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2007 Sept;71(3):495–548. doi: 10.1128/MMBR.00005-07PubMed PMID: 17804669; PMCID: PMC2168647

23. 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.67.5.2428-2432.1999PubMed PMID: 10225905; PMCID: PMC115988
24. Du B, Song Z, Yuan M, Duan Y, Xu S, Qiu X, Li Z. Molecular mechanisms underlying *Nocardia* host interactions. *Front Cell Infect Microbiol*. 2026;16:1780562. doi: 10.3389/fcimb.2026.1780562PubMed PMID: 41859465; PMCID: PMC12996158
25. González Suárez ML. Inmunidad pasiva con anticuerpos monoclonales IgM E IgG ANTI-P61 en la infección experimental por *Nocardia brasiliensis* [Internet] [phd]. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2009.
26. Rosas-Taraco AG, Perez-Liñan AR, Bocanegra-Ibarias P, Perez-Rivera LI, Salinas-Carmona MC. *Nocardia brasiliensis* Induces an Immunosuppressive Microenvironment That Favors Chronic Infection in BALB/c Mice. *Infect Immun*. 2012 July;80(7):2493–9. doi: 10.1128/IAI.06307-11PubMed PMID: 22547544; PMCID: PMC3416455
27. Trevino-Villarreal JH, Vera-Cabrera L, Valero-Guillén PL, Salinas-Carmona MC. *Nocardia brasiliensis* cell wall lipids modulate macrophage and dendritic responses that favor development of experimental actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect Immun*. 2012 Oct;80(10):3587–601. doi: 10.1128/IAI.00446-12PubMed PMID: 22851755; PMCID: PMC3457583
28. Meester I, Rosas-Taraco AG, Salinas-Carmona MC. *Nocardia brasiliensis* Induces Formation of Foamy Macrophages and Dendritic Cells In Vitro and In Vivo. *PLOS ONE*. Public Library of Science; 2014 June 17;9(6):e100064. doi: 10.1371/journal.pone.0100064
29. Rodríguez Serrato MA. Análisis de los centros germinales inducidos por antígenos particulados y solubles de *Nocardia brasiliensis* en ratones Balb/c. 2017. Available from
30. Vazquez-Marmolejo AV, Lopez-Lopez N, Ascacio-Martinez JA, Valadez-Calderon JG, Espinoza-Martinez PE, Salinas-Carmona MC. Nitric oxide determines the development of actinomycetoma by *Nocardia brasiliensis* in eNOS knockout C57BL/6 mice. *FEMS Microbiol Lett*. 2021 May 11;368(8):fnab048. doi: 10.1093/femsle/fnab048PubMed PMID: 33956121
31. Vázquez-Marmolejo AV, Duarte-Mata DI, Ruiz-De La Cruz ML, López-López N, Salinas-Carmona MC, Mejía-Torres M. Increased expression of the PD-1/PD-L1 regulatory axis in tissue leukocytes from experimental actinomycetoma by *Nocardia brasiliensis* in BALB/c mice. *Microb Pathog*. 2025 Aug;205:107697. doi: 10.1016/j.micpath.2025.107697PubMed PMID: 40368069
32. Ruiz-de la Cruz ML, Vazquez -Marmolejo AV, Mejia-Torres MG, Castro-Corona aria de los A, Salinas-Carmona MC. Sustained neutrophil infiltration and bacterial grain morphology underlie chronic mycetoma pathology in a murine model. *Iran J Basic Med*

Sci. 2025;28(9):1268–78. doi: 10.22038/ijbms.2025.87349.18875PubMed PMID: 40809173; PMCID: PMC12340410

33. Flores-Aldaba KA, Vázquez-Marmolejo AV, Vargas-Villarreal J, Ocampo-Candiani J, Cantú-Álvarez MG, Espinoza-Martínez PE, Salinas-Carmona MC, Vera-Cabrera L. Immune response in BALB/c mice to an attenuated strain of *Nocardia brasiliensis*. Microb Pathog. 2025 July 1;204:107612. doi: 10.1016/j.micpath.2025.107612

34. Pavon L, Jiménez M del C, Garcés ME. Inmunología Molecular, Celular y Traslacional. Lippincott Williams & Wilkins; 2016.

35. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. Front Immunol. Frontiers; 2016 Jan 6;6. doi: 10.3389/fimmu.2015.00620

36. da Silva EZM, Jamur MC, Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell. J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc. 2014 Oct;62(10):698–738. doi: 10.1369/0022155414545334PubMed PMID: 25062998; PMCID: PMC4230976

37. Pahima HT, Dwyer DF. Update on mast cell biology. J Allergy Clin Immunol. 2025 Apr;155(4):1115–23. doi: 10.1016/j.jaci.2024.12.1092PubMed PMID: 39800266

38. Dahlin JS, Hallgren J. Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues. Mol Immunol. 2015 Jan 1;63(1):9–17. doi: 10.1016/j.molimm.2014.01.018

39. Reber L, Da Silva CA, Frossard N. Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. Eur J Pharmacol. 2006 Mar 8;533(1):327–40. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.12.067

40. Collington SJ, Williams TJ, Weller CL. Mechanisms underlying the localisation of mast cells in tissues. Trends Immunol. 2011 Oct;32(10):478–85. doi: 10.1016/j.it.2011.08.002PubMed PMID: 21917522

41. Keith YH, Honda T, Ono S, Lee B, Shibuya R, Hanakawa S, Ishida Y, Nakamizo S, Kabashima K. Infiltration and local differentiation of bone marrow-derived integrin β 7-positive mast cell progenitors in atopic dermatitis-like skin. J Allergy Clin Immunol. 2023 Jan;151(1):159-171.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2022.09.011PubMed PMID: 36122789

42. Thapaliya M, Ali H. GRK2 differentially regulates Fc ϵ RI and MRGPRB2-mediated responses in mast cells. Front Immunol. 2023 Mar 29;14:1155777. doi: 10.3389/fimmu.2023.1155777PubMed PMID: 37063868; PMCID: PMC10090543

43. Suárez Vázquez TA, López López N, Salinas Carmona MC. MASTER cell: chief immune modulator and inductor of antimicrobial immune response. Front Immunol. Frontiers; 2024 Apr 4;15. doi: 10.3389/fimmu.2024.1360296

44. Agier J, Pastwińska J, Brzezińska-Błaszczyk E. An overview of mast cell pattern recognition receptors. Inflamm Res. 2018;67(9):737–46. doi: 10.1007/s00011-018-1164-5PubMed PMID: 29909493; PMCID: PMC6096630

45. Irani AM, Bradford TR, Kepley CL, Schechter NM, Schwartz LB. Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J Histochem Cytochem*. 1989 Oct;37(10):1509–15. doi: 10.1177/37.10.2674273
46. Church MK, Levi-Schaffer F. The human mast cell. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Feb 1;99(2):155–60. doi: 10.1016/S0091-6749(97)70089-7
47. Abraham D, Oster H, Huber M, Leitges M. The expression pattern of three mast cell specific proteases during mouse development. *Mol Immunol*. 2007 Feb 1;44(5):732–40. doi: 10.1016/j.molimm.2006.04.019
48. Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, Marcet C, Yoshimura T, Sekar Y, Befus AD. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol*. Nature Publishing Group; 2010 Mar;3(2):111–28. doi: 10.1038/mi.2009.136
49. Jiménez M, Cervantes-García D, Córdova-Dávalos LE, Pérez-Rodríguez MJ, Gonzalez-Espinosa C, Salinas E. Responses of Mast Cells to Pathogens: Beneficial and Detrimental Roles. *Front Immunol*. Frontiers; 2021 June 15;12. doi: 10.3389/fimmu.2021.685865
50. Tauber M, Basso L, Martin J, Bostan L, Pinto MM, Thierry GR, Houmadi R, Serhan N, Loste A, Blériot C, Kamphuis JBJ, Grujic M, Kjellén L, Pejler G, Paul C, Dong X, Galli SJ, Reber LL, Ginhoux F, Bajenoff M, Gentek R, Gaudenzio N. Landscape of mast cell populations across organs in mice and humans. *J Exp Med*. 2023 July 18;220(10):e20230570. doi: 10.1084/jem.20230570PubMed PMID: 37462672; PMCID: PMC10354537
51. Nakahata T, Kobayashi T, Ishiguro A, Tsuji K, Naganuma K, Ando O, Yagi Y, Tadokoro K, Akabane T. Extensive proliferation of mature connective-tissue type mast cells in vitro. *Nature*. 1986 Nov 6;324(6092):65–7. doi: 10.1038/324065a0PubMed PMID: 3491321
52. Barra J, Marshall JS. Highlight of 2023: Advances in mast cells. *Immunol Cell Biol*. 2024 July;102(6):452–5. doi: 10.1111/imcb.12768PubMed PMID: 38714317
53. Tontini C, Bahri R, Higham A, Singh D, Simpson A, Bulfone-Paus S. Microenvironment-Driven Mast Cell Plasticity: Insights From Cytokine-Activated Gene Signatures in Skin and Respiratory Diseases. *Allergy*. 2025;80(11):3077–94. doi: 10.1111/all.70052
54. Derakhshan T, Hollers E, Perniss A, Ryan T, McGill A, Hacker J, Bergmark RW, Bhattacharyya N, Lee SE, Maxfield AZ, Roditi RE, Bankova L, Buchheit KM, Laidlaw TM, Boyce JA, Dwyer DF. Human intraepithelial mast cell differentiation and effector function are directed by TGF- β signaling. *J Clin Invest*. 2025 Jan 2;135(1):e174981. doi: 10.1172/JCI174981PubMed PMID: 39744949; PMCID: PMC11684804

55. Ribatti D. Mast cells are at the interface between the external environment and the inner organism. *Front Med.* 2024 Jan 4;10:1332047. doi: 10.3389/fmed.2023.1332047PubMed PMID: 38239615; PMCID: PMC10794488
56. Xiang Z, Block M, Löfman C, Nilsson G. IgE-mediated mast cell degranulation and recovery monitored by time-lapse photography☆. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 July;108(1):116–21. doi: 10.1067/mai.2001.116124
57. Rauter I, Krauth MT, Westritschnig K, Horak F, Flicker S, Gieras A, Repa A, Balic N, Spitzauer S, Huss-Marp J, Brockow K, Darsow U, Behrendt H, Ring J, Kricek F, Valent P, Valenta R. Mast cell-derived proteases control allergic inflammation through cleavage of IgE. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Jan;121(1):197–202. doi: 10.1016/j.jaci.2007.08.015PubMed PMID: 17904627
58. Al-Maamari A, Sultan M, Ding S, Yuxin D, Wang MY, Su S. Mechanisms and implications of histamine-induced reactions and complications. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2025;53(3):122–39. doi: 10.15586/aei.v53i3.1272PubMed PMID: 40342122
59. De Filippo K, Dudeck A, Hasenberg M, Nye E, Van Rooijen N, Hartmann K, Gunzer M, Roers A, Hogg N. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood.* 2013 June 13;121(24):4930–7. doi: 10.1182/blood-2013-02-486217
60. Iskarpatyoti JA, Shi J, Abraham MA, Rathore APS, Miao Y, Abraham SN. Mast cell regranulation requires a metabolic switch involving mTORC1 and a glucose-6-phosphate transporter. *Cell Rep.* 2022 Sept 27;40(13):111346. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111346
61. Quan PL, Sabaté-Brescó M, Guo Y, Martín M, Gastaminza G. The Multifaceted Mas-Related G Protein-Coupled Receptor Member X2 in Allergic Diseases and Beyond. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 23;22(9):4421. doi: 10.3390/ijms22094421PubMed PMID: 33922606; PMCID: PMC8122879
62. Kumar M, Choi YG, Wong T, Li PH, Chow BKC. Beyond the classic players: Mas-related G protein-coupled receptor member X2 role in pruritus and skin diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* 2025 Mar;39(3):476–86. doi: 10.1111/jdv.20249PubMed PMID: 39044547; PMCID: PMC11851267
63. Piotin A, Oulehri W, Charles AL, Tacquard C, Collange O, Mertes PM, Geny B. Oxidative Stress and Mitochondria Are Involved in Anaphylaxis and Mast Cell Degranulation: A Systematic Review. *Antioxidants.* Basel, Switzerland; 2024 July 29;13(8):920. doi: 10.3390/antiox13080920PubMed PMID: 39199166; PMCID: PMC11352116
64. Voelker D, Pongdee T. Biomarkers in the diagnosis of mast cell activation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2025 Feb 1;25(1):27–33. doi: 10.1097/ACI.0000000000001046PubMed PMID: 39745330; PMCID: PMC11676608

65. Kumar S, Sharma B, Bhadwal P, Sharma P, Agnihotri N. Lipids as Nutraceuticals: A Shift in Paradigm. 2018.
66. Bando T, Fujita S, Nagano N, Yoshikawa S, Yamanishi Y, Minami M, Karasuyama H. Differential usage of COX-1 and COX-2 in prostaglandin production by mast cells and basophils. *Biochem Biophys Res.* 2017 July 1;10:82–7. doi: 10.1016/j.bbrep.2017.03.004
67. Rådmark O, Samuelsson B. 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50(Suppl):S40–5. doi: 10.1194/jlr.R800062-JLR200PubMed PMID: 18987389; PMCID: PMC2674731
68. Gill P, Jindal NL, Jagdis A, Vadas P. Platelets in the immune response: Revisiting platelet-activating factor in anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 June;135(6):1424–32. doi: 10.1016/j.jaci.2015.04.019PubMed PMID: 26051949
69. Gurish MF, Bryce PJ, Tao H, Kisselgof AB, Thornton EM, Miller HR, Friend DS, Oettgen HC. IgE Enhances Parasite Clearance and Regulates Mast Cell Responses in Mice Infected with *Trichinella spiralis*. *J Immunol.* 2004 Jan 15;172(2):1139–45. doi: 10.4049/jimmunol.172.2.1139
70. Junkins RD, Carrigan SO, Wu Z, Stadnyk AW, Cowley E, Issekutz T, Berman J, Lin TJ. Mast cells protect against *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury. *Am J Pathol.* 2014 Aug;184(8):2310–21. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.05.009PubMed PMID: 25043620
71. Chu Y, Wan S, Anderson R, Lin Y. Mast cell–macrophage dynamics in modulation of dengue virus infection in skin. *Immunology.* 2015 Sept;146(1):163–72. doi: 10.1111/imm.12492
72. De Zuani M, Paolicelli G, Zelante T, Renga G, Romani L, Arzese A, Pucillo CEM, Frossi B. Mast Cells Respond to *Candida albicans* Infections and Modulate Macrophages Phagocytosis of the Fungus. *Front Immunol.* 2018 Nov 30;9:2829. doi: 10.3389/fimmu.2018.02829
73. Soria-Castro R, Alfaro-Doblado ÁR, Rodríguez-López G, Campillo-Navarro M, Meneses-Preza YG, Galán-Salinas A, Alvarez-Jimenez V, Yam-Puc JC, Munguía-Fuentes R, Domínguez-Flores A, Estrada-Parra S, Pérez-Tapia SM, Chávez-Blanco AD, Chacón-Salinas R. TLR2 Regulates Mast Cell IL-6 and IL-13 Production During *Listeria monocytogenes* Infection. *Front Immunol.* 2021;12:650779. doi: 10.3389/fimmu.2021.650779PubMed PMID: 34194428; PMCID: PMC8238461
74. Villareal-Rivota B, Meneses-Preza YG, Campillo-Navarro M, Ruiz-Sánchez BP, Soria-Castro R, Barrios-Payán J, Mata-Espinosa D, Donis-Maturano L, Pérez-Tapia SM, Chávez-Blanco AD, Estrada-Parra S, Hernández-Pando R, Chacón-Salinas R. Impaired control of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mast cell-deficient Kit^{W-sh}/W^{-sh} mice. *Tuberculosis.* 2025 Jan;150:102587. doi: 10.1016/j.tube.2024.102587

75. Agier J, Brzezińska-Błaszczyk E. Cathelicidins and defensins regulate mast cell antimicrobial activity. *Postepy Hig Med Dosw.* Online; 2016 June 16;70(0):618–36. doi: 10.5604/17322693.1205357PubMed PMID: 27333932
76. Garcia-Rodriguez KM, Bahri R, Sattentau C, Roberts IS, Goenka A, Bulfone-Paus S. Human mast cells exhibit an individualized pattern of antimicrobial responses. *Immun Inflamm Dis.* 2020 June;8(2):198–210. doi: 10.1002/iid3.295PubMed PMID: 32222064; PMCID: PMC7212193
77. Elieh Ali Komi D, Kuebler WM. Significance of Mast Cell Formed Extracellular Traps in Microbial Defense. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2022 Feb;62(1):160–79. doi: 10.1007/s12016-021-08861-6PubMed PMID: 34024033; PMCID: PMC8140557
78. Subramanian H, Gupta K, Ali H. Roles of MAS-related G protein coupled receptor-X2 (MRGPRX2) on mast cell-mediated host defense, pseudoallergic drug reactions and chronic inflammatory diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Sept;138(3):700–10. doi: 10.1016/j.jaci.2016.04.051PubMed PMID: 27448446; PMCID: PMC5014572
79. Pundir P, Liu R, Vasavda C, Serhan N, Limjunyawong N, Yee R, Zhan Y, Dong X, Wu X, Zhang Y, Snyder SH, Gaudenzio N, Vidal JE, Dong X. A Connective Tissue Mast Cell-Specific Receptor Detects Bacterial Quorum Sensing Molecules and Mediates Antibacterial Immunity. *Cell Host Microbe.* 2019 July 10;26(1):114-122.e8. doi: 10.1016/j.chom.2019.06.003PubMed PMID: 31278040; PMCID: PMC6649664
80. Chompunud Na Ayudhya C, Roy S, Thapaliya M, Ali H. Roles of a Mast Cell–Specific Receptor MRGPRX2 in Host Defense and Inflammation. *J Dent Res.* 2020 July;99(8):882–90. doi: 10.1177/0022034520919107PubMed PMID: 32392433; PMCID: PMC7346743
81. Starkl P, Watzenboeck ML, Popov LM, Zahalka S, Hladik A, Lakovits K, Radhouani M, Haschemi A, Marichal T, Reber LL, Gaudenzio N, Sibillano R, Stulik L, Fontaine F, Mueller AC, Amieva MR, Galli SJ, Knapp S. IgE Effector Mechanisms, in Concert with Mast Cells, Contribute to Acquired Host Defense against *Staphylococcus aureus*. *Immunity.* 2020 Oct 13;53(4):793-804.e9. doi: 10.1016/j.immuni.2020.08.002
82. Muñoz S, Hernández-Pando R, Abraham SN, Enciso JA. Mast Cell Activation by *Mycobacterium tuberculosis* : Mediator Release and Role of CD48. *J Immunol.* 2003 June 1;170(11):5590–6. doi: 10.4049/jimmunol.170.11.5590
83. Carlos D, Frantz FG, Souza-Júnior DA, Jamur MC, Oliver C, Ramos SG, Quesniaux VF, Ryffel B, Silva CL, Bozza MT, Faccioli LH. TLR2-dependent mast cell activation contributes to the control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect.* 2009 July 1;11(8):770–8. doi: 10.1016/j.micinf.2009.04.025
84. Garcia-Rodriguez KM, Goenka A, Thomson DD, Bahri R, Tontini C, Salcman B, Hernandez-Pando R, Bulfone-Paus S. Bacillus Calmette–Guérin-Induced Human Mast

Cell Activation Relies on IL-33 Priming. *Int J Mol Sci.* 2022 July 7;23(14):7549. doi: 10.3390/ijms23147549

85. Gupta A, Taneja V, Moreno JR, Naqvi N, Abhimanyu null, Tao Y, Ahmed M, Chauhan KS, de León DTP, Ramírez-Martínez G, Jiménez-Alvarez L, Luna-Rivero C, Zuniga J, Kaushal D, Khader SA. Mast cells promote pathology and susceptibility in tuberculosis. *BioRxiv Prepr Serv Biol.* 2025 Sept 13;2024.09.04.611333. doi: 10.1101/2024.09.04.611333PubMed PMID: 39314389; PMCID: PMC11418949

86. McDermott JR, Bartram RE, Knight PA, Miller HRP, Garrod DR, Grecis RK. Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proc Natl Acad Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences;* 2003 June 24;100(13):7761–6. doi: 10.1073/pnas.1231488100

87. Saha B, Tonkal AMDJ, Croft S, Roy S. Mast cells at the host-pathogen interface: host-protection versus immune evasion in leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 2004 July;137(1):19–23. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02505.xPubMed PMID: 15196239; PMCID: PMC1809096

88. Wilainam P, Nintasen R, Viriyavejakul P. Mast cell activation in the skin of *Plasmodium falciparum* malaria patients. *Malar J.* 2015 Feb 7;14:67. doi: 10.1186/s12936-015-0568-8PubMed PMID: 25879828; PMCID: PMC4326495

89. Siebenhaar F, Syska W, Weller K, Magerl M, Zuberbier T, Metz M, Maurer M. Control of *Pseudomonas aeruginosa* Skin Infections in Mice Is Mast Cell-Dependent. *Am J Pathol.* 2007 June;170(6):1910–6. doi: 10.2353/ajpath.2007.060770

90. Di Nardo A, Yamasaki K, Dorschner RA, Lai Y, Gallo RL. Mast Cell Cathelicidin Antimicrobial Peptide Prevents Invasive Group A *Streptococcus* Infection of the Skin. *J Immunol.* 2008 June 1;180(11):7565–73. doi: 10.4049/jimmunol.180.11.7565

91. Goldmann O, Sauerwein T, Molinari G, Rohde M, Förstner KU, Medina E. Cytosolic Sensing of Intracellular *Staphylococcus aureus* by Mast Cells Elicits a Type I IFN Response That Enhances Cell-Autonomous Immunity. *J Immunol.* 2022 Apr 1;208(7):1675–85. doi: 10.4049/jimmunol.2100622

92. Muñoz S, Rivas-Santiago B, Enciso JA. Mycobacterium tuberculosis entry into mast cells through cholesterol-rich membrane microdomains. *Scand J Immunol.* 2009 Sept;70(3):256–63. doi: 10.1111/j.1365-3083.2009.02295.xPubMed PMID: 19703015

93. Mejía-Torres M, Coronado-Rodríguez F, Franco-Marquez R, Salinas-Carmona MC. Cutaneous nocardiosis and cutaneous tuberculosis induce similar expression of inflammation-related markers in human skin granulomatous infections. *Rev Med Univ.* 2024 Sept 2;26(3):074–80.

94. Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest.* 2002 May 15;109(10):1351–9. doi: 10.1172/JCI0214704

95. Campillo-Navarro M, Leyva-Paredes K, Donis-Maturano L, González-Jiménez M, Paredes-Vivas Y, Cerbulo-Vázquez A, Serafín-López J, García-Pérez B, Ullrich SE, Flores-Romo L, Pérez-Tapia SM, Estrada-Parra S, Estrada-García I, Chacón-Salinas R. *Listeria monocytogenes* induces mast cell extracellular traps. *Immunobiology*. 2017 Feb;222(2):432–9. doi: 10.1016/j.imbio.2016.08.006
96. Garcia-Rodriguez KM, Bini EI, Gamboa-Domínguez A, Espitia-Pinzón CI, Huerta-Yepez S, Bulfone-Paus S, Hernández-Pando R. Differential mast cell numbers and characteristics in human tuberculosis pulmonary lesions. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2021 May 21;11(1):10687. doi: 10.1038/s41598-021-89659-6
97. Nigrovic PA, Gray DHD, Jones T, Hallgren J, Kuo FC, Chaletzky B, Gurish M, Mathis D, Benoist C, Lee DM. Genetic inversion in mast cell-deficient (Wsh) mice interrupts corin and manifests as hematopoietic and cardiac aberrancy. *Am J Pathol*. 2008 Dec;173(6):1693–701. doi: 10.2353/ajpath.2008.080407PubMed PMID: 18988802; PMCID: PMC2626381
98. Berrozpe G, Agosti V, Tucker C, Blanpain C, Manova K, Besmer P. A Distant Upstream Locus Control Region Is Critical for Expression of the Kit Receptor Gene in Mast Cells. *Mol Cell Biol*. Taylor & Francis; 2006 Aug 1;26(15):5850–60. doi: 10.1128/MCB.01854-05PubMed PMID: 16847336
99. Grimbaldston MA, Chen CC, Piliponsky AM, Tsai M, Tam SY, Galli SJ. Mast Cell-Deficient W-sash c-kit Mutant KitW-sh/W-sh Mice as a Model for Investigating Mast Cell Biology in Vivo. *Am J Pathol*. 2005 Sept;167(3):835–48. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62055-XPubMed PMID: 16127161; PMCID: PMC1698741
100. Gaudenzio N, Sibilano R, Starkl P, Tsai M, Galli SJ, Reber LL. Analyzing the Functions of Mast Cells In Vivo Using “Mast Cell Knock-in” Mice. *J Vis Exp JoVE*. 2015 May 27;(99):52753. doi: 10.3791/52753PubMed PMID: 26068439; PMCID: PMC4542964
101. Jachetti E, D’Inca F, Danelli L, Magris R, Dal Secco C, Vit F, Cancila V, Tripodo C, Scapini P, Colombo MP, Pucillo C, Frossi B. Frontline Science: Mast cells regulate neutrophil homeostasis by influencing macrophage clearance activity. *J Leukoc Biol*. 2019 Apr;105(4):633–44. doi: 10.1002/JLB.4HI1018-390RPubMed PMID: 30817046
102. 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.2014.01.104PubMed PMID: 25256873; PMCID: PMC4536070
103. Leary S, Pharmaceuticals F, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Johnson CL, Patterson-Kane E. *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition*. 2020;

104. Kawai S, Takagi Y, Kaneko S, Kurosawa T. Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp Anim*. 2011 Jan 1;60(5):481–7. doi: 10.1538/expanim.60.481PubMed PMID: 22041285
105. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArd DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, James JA, Salto-Tellez M, Hamilton PW. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*. 2017 Dec 4;7:16878. doi: 10.1038/s41598-017-17204-5PubMed PMID: 29203879; PMCID: PMC5715110
106. Salinas-Carmona MC. Anticuerpos Anti-Nocardia brasiliensis en pacientes con actinomicetoma y su utilidad clínica. *Gac Médica México*. 2001;137(1):1–8.
107. Shackelford C, Long G, Wolf J, Okerberg C, Herbert R. Qualitative and quantitative analysis of nonneoplastic lesions in toxicology studies. *Toxicol Pathol*. 2002;30(1):93–6. doi: 10.1080/01926230252824761PubMed PMID: 11890482
108. Yamamoto T, Hartmann K, Eckes B, Krieg T. Mast cells enhance contraction of three-dimensional collagen lattices by fibroblasts by cell–cell interaction: role of stem cell factor/c-kit. *Immunology*. 2000 Mar;99(3):435–9. doi: 10.1046/j.1365-2567.2000.00973.xPubMed PMID: 10712674; PMCID: PMC2327175
109. Moiseeva EP, Roach KM, Leyland ML, Bradding P. CADM1 is a key receptor mediating human mast cell adhesion to human lung fibroblasts and airway smooth muscle cells. *PloS One*. 2013;8(4):e61579. doi: 10.1371/journal.pone.0061579PubMed PMID: 23620770; PMCID: PMC3631237
110. Pincha N, Hajam EY, Badarinath K, Batta SPR, Masudi T, Dey R, Andreasen P, Kawakami T, Samuel R, George R, Danda D, Jacob PM, Jamora C. PAI1 mediates fibroblast-mast cell interactions in skin fibrosis. *J Clin Invest*. 2018 May 1;128(5):1807–19. doi: 10.1172/JCI99088PubMed PMID: 29584619; PMCID: PMC5919880
111. Younesi FS, Miller AE, Barker TH, Rossi FMV, Hinz B. Fibroblast and myofibroblast activation in normal tissue repair and fibrosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2024 Aug;25(8):617–38. doi: 10.1038/s41580-024-00716-0PubMed PMID: 38589640
112. Mbanwi AN, Wang C, Geddes K, Philpott DJ, Watts TH. Irreversible splenic atrophy following chronic LCMV infection is associated with compromised immunity in mice. *Eur J Immunol*. 2017 Jan;47(1):94–106. doi: 10.1002/eji.201646666PubMed PMID: 27730627
113. Hult C, Mattila JT, Gideon HP, Linderman JJ, Kirschner DE. Neutrophil Dynamics Affect Mycobacterium tuberculosis Granuloma Outcomes and Dissemination. *Front Immunol*. 2021 Oct 5;12:712457. doi: 10.3389/fimmu.2021.712457PubMed PMID: 34675916; PMCID: PMC8525425
114. Vázquez-Marmolejo AV, Duarte-Mata DI, De La Cruz MLR, López-López N, Salinas-Carmona MC, Mejía-Torres M. Increased Expression of the Pd-1/Pd-L1

Regulatory Axis in Tissue Leukocytes from Experimental Actinomycetoma by *Nocardia Brasiliensis* in Balb/C Mice [Internet]. SSRN; 2024.

115. Miller LS, O'Connell RM, Gutierrez MA, Pietras EM, Shahangian A, Gross CE, Thirumala A, Cheung AL, Cheng G, Modlin RL. MyD88 Mediates Neutrophil Recruitment Initiated by IL-1R but Not TLR2 Activation in Immunity against *Staphylococcus aureus*. *Immunity*. 2006 Jan;24(1):79–91. doi: 10.1016/j.immuni.2005.11.011

116. Vieira SM, Lemos HP, Grespan R, Napimoga MH, Dal-Secco D, Freitas A, Cunha TM, Verri WA, Souza-Junior DA, Jamur MC, Fernandes KS, Oliver C, Silva JS, Teixeira MM, Cunha FQ. A crucial role for TNF-alpha in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. *Br J Pharmacol*. 2009 Oct;158(3):779–89. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00367.xPubMed PMID: 19702783; PMCID: PMC2765597

117. Youn C, Pontaza C, Wang Y, Dikeman DA, Joyce DP, Alphonse MP, Wu MJ, Nolan SJ, Anany MA, Ahmadi M, Young J, Tocaj A, Garza LA, Wajant H, Miller LS, Archer NK. Neutrophil-intrinsic TNF receptor signaling orchestrates host defense against *Staphylococcus aureus*. *Sci Adv*. 2023 June 16;9(24):eadf8748. doi: 10.1126/sciadv.adf8748

118. Fielding CA, McLoughlin RM, McLeod L, Colmont CS, Najdovska M, Grail D, Ernst M, Jones SA, Topley N, Jenkins BJ. IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. *J Immunol*. Baltimore, Md. : 1950; 2008 Aug 1;181(3):2189–95. doi: 10.4049/jimmunol.181.3.2189PubMed PMID: 18641358