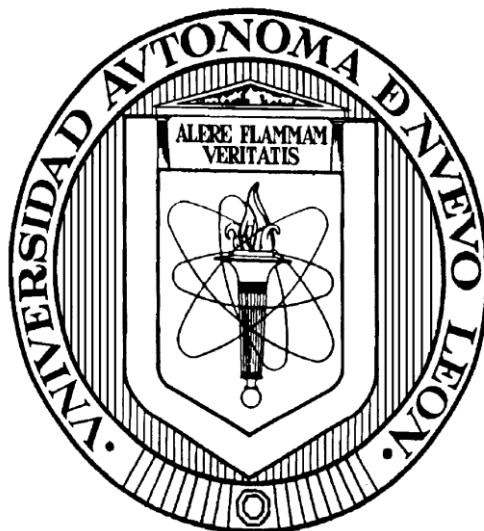


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL BLOQUEO DE PD-L1 CON
UN ANTICUERPO MONOCLONAL EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE ACTINOMICETOMA POR *Nocardia
brasiliensis*.**

PRESENTA

M.L.H. MARIA LUISA RUIZ DE LA CRUZ

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

JULIO 2026

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL BLOQUEO DE PD-L1 CON UN ANTICUERPO MONOCLONAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ACTINOMICETOMA POR *Nocardia brasiliensis*.



Dr. C. Mario César Salinas Carmona

Director de Tesis



Dra. C. Anna Velia Vázquez Marmolejo

Codirector de tesis



Dr. C. Manuel Guadalupe Mejía Torres

Miembro de la Comisión de Tesis



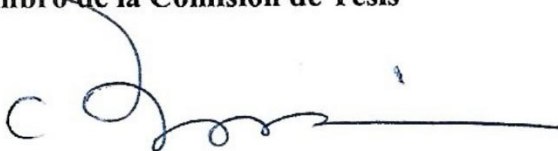
Dra. C. María de los Ángeles Castro Corona

Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. C. Rogelio de Jesús Treviño Rangel

Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL BLOQUEO DE PD-L1 CON UN ANTICUERPO MONOCLONAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ACTINOMICETOMA POR *Nocardia brasiliensis*

Presentado por:

M.L.H. María Luisa Ruiz de la Cruz

Este trabajo se realizó en el Servicio de Inmunología, Facultad de Medicina y Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Mario César Salinas Carmona en el periodo de agosto del 2022 a julio del 2026.



Dr. C. Mario César Salinas Carmona

Director de Tesis



Dra. C. Anna Velia Vázquez Marmolejo

Codirector de tesis



Dr. C. Manuel Guadalupe Mejía Torres

Miembro de la Comisión de Tesis



Dra. C. María de los Ángeles Castro Corona

Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. C. Rogelio de Jesús Treviño Rangel

Miembro de la Comisión de Tesis

DEDICATORIA

A Armando García, mi esposo, compañero de vida y de sueños. Por una década de amor incondicional, trabajo compartido y sacrificio silencioso para que yo pudiera crecer, profesional y personalmente. Cada logro, cada meta alcanzada, tiene tu nombre grabado.

A todas las mujeres en la ciencia. A las que, con inteligencia y resiliencia, desafían al sistema. A las que persisten ante la duda y se niegan a que les apaguen la chispa de la curiosidad. A las que convierten cada obstáculo en un escalón y cada silencio en una pregunta. Sigán siendo esa fuerza imparable que la ciencia tanto necesita.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. C. Mario César Salinas Carmona, mi director de tesis, por su guía constante a lo largo de este proyecto, por abrirme las puertas del Servicio de Inmunología y permitirme crecer en un entorno de excelencia académica.

A mi comisión de tesis: Dra. C. Anna Velia Vázquez Marmolejo, Dr. C. Manuel G. Mejía Torres, Dra. C. María de los Ángeles Castro Corona y Dr. C. Rogelio de Jesús Treviño Rangel, por compartir generosamente su conocimiento, su vasta experiencia y sus acertados consejos, que no solo enriquecieron este trabajo, sino que también fortalecieron mis habilidades y mi pensamiento crítico en el laboratorio.

Al Dr. Carlos E. Medina de la Garza, por su respaldo y acompañamiento durante mi posgrado.

A la Dra. Ivett C. Miranda y a la técnica Lucero de Santiago, del Departamento de Patología, por su invaluable colaboración en el procesamiento e interpretación de las muestras histológicas, pieza fundamental de esta investigación.

A los profesores y al personal del Servicio de Inmunología, así como a mis compañeros de posgrado, por ser pilares en este camino. Cada uno de ustedes, desde su propio lugar y con su visión única, contribuyó a mi crecimiento personal y profesional durante esta travesía de cuatro años.

Finalmente, a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), por la beca otorgada (CVU 1194333), que hizo posible mi formación en el programa de Doctorado en Ciencias y me permitió dedicarme por completo a esta meta.

CONTENIDO

CONTENIDO	vi
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Infecciones bacterianas crónicas	1
1.2 Micetoma como paradigma de infección bacteriana crónica	3
1.3 Epidemiología del micetoma	3
1.3.1 Distribución mundial	4
1.3.2 Micetoma en México	5
1.4 Mecanismos de transmisión	5
1.5 Clasificación etiológica	6
1.6 Actinomicetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i>	6
1.7 Desafíos terapéuticos del actinomicetoma	7
1.7.1 Resistencia a los antimicrobianos	8
1.7.2 Refratariedad a la terapia por la naturaleza de la infección	8
1.8 Características histológicas del actinomicetoma	9
1.9 Inmunopatología del actinomicetoma	12
1.9.1 Cinética de la infección y características histopatológicas generales	12
1.9.2 Respuesta inmune en la fase aguda de la infección	13
1.9.3 Respuesta inmune durante la etapa crónica de la infección	13
1.10 Puntos de control de la respuesta inmune: el paradigma del agotamiento de las células T	16

1.10.1	Mecanismos moleculares de la modulación por puntos de control inmune	19
1.10.2	El papel protector de los puntos de control inmunitario en infecciones bacterianas crónicas	24
1.10.3	Dinámica de los puntos de control y las citocinas en la infección bacteriana crónica	25
1.10.4	Papel de las células mieloides y los puntos de control inmune en los nichos inmunosupresores del granuloma y el grano actinomicótico.	26
1.11	Terapias con inhibidores de puntos de control en infecciones crónicas	27
1.11.1	Validación del uso de anticuerpos monoclonales como inhibidores de punto de control en modelos animales.....	27
1.11.2	Evidencia del bloqueo de PD-1 y PD-L1 en infecciones virales, fúngicas y parasitarias	29
1.11.3	Evidencia del bloqueo de PD-1 y PD-L1 en infecciones bacterianas.	29
1.12	Perspectivas para el actinomicetoma por <i>N. brasiliensis</i>	31
2	ANTECEDENTES	33
3	JUSTIFICACIÓN	35
4	HIPÓTESIS	36
5	OBJETIVOS	37
5.1	Objetivo general	37
5.2	Objetivos específicos	37

6	ESTRATEGIA GENERAL	38
6.1	Diseño experimental.....	38
6.2	Aprobación por el comité de ética	38
6.3	Tamaño de la muestra	39
6.4	Manejo de animales de laboratorio	40
6.5	Supervisión del bienestar animal y punto final humanitario.....	41
7	METODOLOGÍA.....	42
7.1	Modelo de infección.....	42
7.1.1	Cepa bacteriana	42
7.1.2	Obtención de la suspensión unicelular de <i>N. brasiliensis</i>	42
7.1.3	Preparación del inóculo de <i>N. brasiliensis</i> para la infección	42
7.1.4	Inducción experimental del actinomicetoma	43
7.1.5	Seguimiento de la evolución del actinomicetoma.....	43
7.2	Esquema de administración del anticuerpo anti-PD-L1.....	44
7.2.1	Administración del anticuerpo monoclonal.	44
7.3	Obtención de muestras biológicas.....	44
7.3.1	Eutanasia.	44
7.3.2	Obtención de sangre total.....	45
7.3.3	Obtención de la suspensión celular a partir de tejido.....	45
7.3.4	Descalcificación del tejido a incluir en parafina	46

7.4	Análisis <i>ex vivo</i> de muestras obtenidas del modelo <i>in vivo</i>	46
7.4.1	Evaluación de la carga bacteriana de <i>N. brasiliensis</i>	46
7.4.2	Inmunofenotipo de células T y mieloides por citometría de flujo	46
7.4.3	Análisis multiplex de citocinas séricas por citometría de flujo.....	51
7.4.4	Histopatología del tejido infectado	51
7.5	Ensayos funcionales <i>in vitro</i>	54
7.5.1	Ensayo de proliferación con CFSE en esplenocitos de ratón BALB/c ...	54
7.5.2	Ensayo de adhesión de neutrófilos en cámara de Boyden modificada ...	57
7.6	Análisis estadístico.....	60
8	RESULTADOS	61
8.1	Evaluación clínica del modelo de actinomicetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i> 61	
8.2	Cuantificación de la carga bacteriana de <i>N. brasiliensis</i> en el tejido infectado 65	
8.3	Evaluación histopatológica del actinomicetoma en el modelo experimental 66	
8.3.1	Organización arquitectónica de los microabscesos granulomatosos en el curso natural de la infección	67
8.3.2	Fenómeno Splendore - Hoespli en la periferia del grano bacteriano.....	69
8.3.3	Necrosis central en el grano bacteriano	70
8.3.4	Infiltrado denso de leucocitos PMN en el núcleo de la lesión	71

8.3.5	Infiltrado leucocitario mixto con presencia de granulocitos y células mononucleares	72
8.3.6	Infiltrado mononuclear perilesional	73
8.3.7	Interfase dermo-epidérmica, reclutamiento e infiltración por granulocitos	75
8.3.8	Respuesta fibroblástica en el modelo de actinomicetoma.....	77
8.3.9	Edema intersticial en la dermis	78
8.3.10	Congestión vascular perilesional.....	79
8.3.11	Paniculitis hipodérmica	80
8.3.12	Infiltración celular perineural.....	82
8.3.13	Compromiso osteoarticular	82
8.3.14	Osteomielitis crónica y remodelación ósea.....	83
8.3.15	Alteraciones en el sistema musculoesquelético profundo.....	86
8.4	Análisis morfométrico del grano.....	87
8.5	Inmunofenotipo del infiltrado celular en el actinomicetoma y órganos linfoides secundarios	90
8.6	Cuantificación de citocinas séricas	95
8.8	Expresión de PD-1 y su ligando PD-L1 en células del actinomicetoma y órganos linfoides secundarios.....	97
8.8.1	Comparación de la expresión de PD-1/PD-L1 entre tejidos	100

8.9	Esquema de administración del anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 humanizado y evaluación clínica de la respuesta	102
8.10	Cuantificación de la carga bacteriana ante el tratamiento con anti-PD-L1 106	
8.11	Evaluación histopatológica de la lesión como respuesta al bloqueo de PD-L1 con un anticuerpo monoclonal	107
8.12	Análisis morfométrico del grano asociado al bloqueo del eje PD-L1	109
8.13	Análisis del inmunofenotipo de la lesión por micetoma y órganos linfoides secundarios tras el bloqueo de PD-L1	112
8.14	Perfil de citocinas séricas tras el bloqueo de PD-L1	115
8.15	Análisis de la expresión del eje PD-1/PD-L1 compartimento-específica en el modelo de actinomicetoma experimental.	116
8.16	Evaluación de la proliferación de esplenocitos en presencia de anti-PD-L1 120	
8.17	Medición de la adhesión de PMN esplénicos tras el bloqueo de PD-L1 en presencia de <i>N. brasiliensis</i> inactivada por calor	121
9	DISCUSIÓN	125
10	CONCLUSIÓN	141
11	LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS	142
12	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
13	ANEXO 1. MATERIALES Y REACTIVOS QUÍMICO-BIOLÓGICOS ...	157

14	ANEXO 2. SOLUCIONES Y AMORTIGUADORES	160
15	ANEXO 3. EQUIPOS DE LABORATORIO	161
16	ANEXO 4. SOFTWARE	162
17	RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	163

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. 1. Enfermedades causadas por bacterias intracelulares con potencial de persistencia o cronificación.....	2
Tabla 2. Anticuerpos marcados con fluorocromos para citometría de flujo	158
Tabla 3. Configuración del citómetro BD LSR Fortessa	161

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de casos reportados de micetoma a nivel mundial	4
Figura 2. Tipos de granuloma en el micetoma.....	11
Figura 3. Señales coestimuladoras y coinhibidoras en los linfocitos y las células presentadoras de antígeno	19
Figura 4. La activación, diferenciación y mecanismos efectores de los linfocitos T cooperadores (CD4+) y citotóxicos (CD8+).....	20
Figura 5. Vías de activación e inhibición en células T CD4+ y células presentadoras de antígeno	22
Figura 6. Medición tridimensional del actinomicetoma en el modelo murino	44
Figura 7. Estrategias de selección por citometría de flujo (<i>gating</i>) para la identificación de poblaciones celulares linfoides y mieloides	48
Figura 8. Evaluación de la expresión de PD-1 y PD-L1 en subpoblaciones leucocitarias mediante citometría de flujo.....	49
Figura 9. Evaluación de la expresión en MFI de PD-1 y PD-L1 y número de células positivas al eje de punto de control en subpoblaciones leucocitarias mediante citometría de flujo	49
Figura 10. Estrategia de análisis de proliferación por CFSE	56
Figura 11. Representación esquemática de la configuración de la cámara de Boyden modificada para el ensayo de adhesión.....	58
Figura 12. Cinética de la lesión en el modelo experimental de actinomicetoma.....	62
Figura 13. Peso corporal de los animales infectados	63

Figura 14. Peso de los tejidos obtenidos del modelo experimental de actinomicetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i>	64
Figura 15. Carga bacteriana de <i>N. brasiliensis</i> en el cojinete plantar	65
Figura 16. Evaluación semicuantitativa de hallazgos patológicos en el tejido infectado con <i>N. brasiliensis</i>	66
Figura 17. Microabsceso granulomatoso crónico por <i>N. brasiliensis</i> en el modelo de actinomicetoma	68
Figura 18. Fenómeno de Splendore-Hoeppli	70
Figura 19. Foco de necrosis supurativa central	71
Figura 20. Infiltrado de PMN en el núcleo lesional	72
Figura 21. Infiltrado mononuclear mixto y evidencia de degranulación	73
Figura 22. Respuesta de macrófagos espumosos	74
Figura 23. Infiltrado mononuclear perilesional	75
Figura 24. Interfase dermo-epidérmica, reclutamiento vascular e infiltración por granulocitos	76
Figura 25. Espectro morfológico de la respuesta fibroblástica y remodelación estromal	78
Figura 26. Edema en la dermis profunda	79
Figura 27. Lecho vascular periférico al actinomicetoma	80
Figura 28. Espectro anatómico de la paniculitis hipodérmica	81
Figura 29. Compromiso neurovascular e infiltración inflamatoria perineural	82
Figura 30. Estructuras osteocartilaginosas profundas	83
Figura 31. Espectro histopatológico de osteomielitis supurativa crónica y remodelación ósea destructiva profunda	85

Figura 32. Miositis degenerativa y atrofia muscular.....	87
Figura 33. Análisis morfométrico de los granos de <i>N. brasiliensis</i> en la fase crónica del actinomicetoma experimental	89
Figura 34. Inmunofenotipo del infiltrado celular en el actinomicetoma experimental por <i>N. brasiliensis</i>	91
Figura 35. Inmunofenotipo de los linfocitos del ganglio linfático poplíteo en el modelo experimental de actinomicetoma por <i>N. brasiliensis</i>	93
Figura 36. Inmunofenotipo de las células del bazo en el modelo experimental de actinomicetoma por <i>N. brasiliensis</i>	94
Figura 37. Cuantificación de citocinas séricas en el modelo experimental de actinomicetoma por <i>N. brasiliensis</i>	96
Figura 38. Expresión de PD-1 y PD-L1 en el tejido del actinomicetoma en el modelo experimental de actinomicetoma por <i>N. brasiliensis</i>	97
Figura 39. Expresión de PD-1 en el ganglio linfático poplíteo en el modelo experimental de actinomicetoma por <i>N. brasiliensis</i>	98
Figura 40 . Expresión de PD-1 y PD-L1 en el bazo en el modelo experimental de actinomicetoma por <i>N. brasiliensis</i>	100
Figura 41. Expresión de PD-1/PD-L1 en actinomicetoma, ganglio y bazo	101
Figura 42. Cronograma experimental para la administración de anti-PD-L1 humanizado en ratones BALB/c infectados crónicamente con <i>N. brasiliensis</i>	102
Figura 43. Curvas de supervivencia durante el tratamiento con atezolizumab.....	103
Figura 44. Evolución del actinomicetoma con la administración del anticuerpo anti-PD-L1	104
Figura 45. Peso de los tejidos al final del tratamiento	105

Figura 46. Carga bacteriana de <i>N. brasiliensis</i> en las lesiones de ratones sobrevivientes	106
Figura 47. Exacerbación inmunopatológica y destrucción tisular masiva tras el bloqueo del eje PD-L1 en el actinomicetoma experimental	108
Figura 48. Evaluación histopatológica de los animales al final del tratamiento con anti-PD-L1	109
Figura 49. Análisis histopatológico comparativo y remodelación morfométrica del grano actinomicótico bajo el bloqueo del eje PD-L1	111
Figura 50. Análisis morfométrico de los granos de <i>N. brasiliensis</i> en los grupos tratados con anti-PD-L1	112
Figura 51. Inmunofenotipo del actinomicetoma en los grupos tratados con anti-PD-L1	113
Figura 52. Inmunofenotipo del ganglio linfático poplíteo en los grupos tratados con anti-PD-L1	114
Figura 53. Inmunofenotipo del bazo en los grupos tratados con anti-PD-L1	115
Figura 54. Perfil de citocinas séricas tras el bloqueo de PD-L1 en el modelo experimental de actinomicetoma por <i>N. brasiliensis</i>	116
Figura 55. Dinámica de expresión de PD-1 y PD-L1 en el actinomicetoma como efecto del bloqueo de PD-L1	117
Figura 56. Dinámica de expresión de PD-1 y PD-L1 en el ganglio linfático poplíteo como efecto del bloqueo de PD-L1	118
Figura 57. Dinámica de expresión de PD-1 y PD-L1 en el bazo como efecto del bloqueo de PD-L1	119
Figura 58. Proliferación de esplenocitos en presencia de anti-PD-L1	120

Figura 59. El bloqueo de PD-L1 revierte la hiperadhesión celular inducida por <i>N. brasiliensis</i> en esplenocitos de ratón con actinomicetoma	122
Figura 60. El bloqueo de PD-L1 disminuye la adhesión celular inducida por <i>N. brasiliensis</i> en esplenocitos de ratón con actinomicetoma	123
Figura 61. Resumen gráfico	124

LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD: 7-aminoactinomicina D

AAD: Anticuerpos Antidroga

ACK: Amortiguador de lisis de amonio-cloruro-potasio (*Ammonium-Chloride-Potassium*)

ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

ANOVA: Análisis de varianza (*Analysis of Variance*)

BATF: Factor de transcripción tipo ATF de cremallera básica de leucina (*Basic leucine zipper ATF-like transcription factor*)

BCS: Puntaje de Condición Corporal (*Body Condition Score*)

BHI: Infusión Cerebro Corazón (*Brain Heart Infusion*)

C3: Componente 3 del complemento

CBA: Ensayo de perlas en suspensión (*Cytometric Bead Array*)

CDC: Citotoxicidad dependiente del complemento

CFSE: Carboxifluoresceína succinimidil éster

CICUAL: Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio

CONBIOÉTICA: Comisión Nacional de Bioética

ConA: Concanavalina A

CPA: Células Presentadoras de Antígeno

cRPMI: Medio RPMI completo

CTLA-4: Antígeno 4 del Linfocito T Citotóxico

Der: derecha

dpi: Días Post-Infección

ELISA: Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration*)

FMO: Fluorescencia menos uno (*Fluorescence Minus One*)

Foxp3: *Forkhead box P3*

FSC-A: Área del frente de dispersión (*Forward Scatter Area*)

FSC-H: Altura del frente de dispersión (*Forward Scatter Height*)

G: *Gauge* (Calibre de aguja)

g: gramo

H&E: Hematoxilina y Eosina

hPD-L1: Ligando de muerte programada 1 humano (*Human Programmed Death-Ligand 1*)

ICI: Inhibidores de puntos de control inmunitario (*Immune Checkpoint Inhibitors*)

IFN- γ : Interferón gamma

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IL: Interleucina

IQR: Rango intercuartil (*Interquartile Range*)

Izq: Izquierda

LAG-3: Gen de Activación de Linfocitos 3

LCMV: Virus de la Coriomeningitis Linfocítica

MAPK: Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos

MCP-1: Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1

MDSC: Células Supresoras Derivadas de la Mieloide

MFI: Intensidad media de fluorescencia (*Median Fluorescence Intensity*)

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

MIP-2: Proteína Inflamatoria de Macrófagos 2

mPD-L1: Ligando de muerte programada 1 murino (*Murine Programmed Death-Ligand 1*)

MSS: Puntaje de Sepsis Murina (*Murine Sepsis Score*)

NF- κ B: Factor Nuclear Kappa B

NOM: Norma Oficial Mexicana

NTD: Enfermedad Tropical Desatendida (*Neglected Tropical Disease*)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAMP: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

PBS: Solución salina fosfatada (*Phosphate Amortiguadored Saline*)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PD-1: Receptor de muerte programada 1 (*Programmed Death 1* / CD279)

PD-L1: Ligando de muerte programada 1 (*Programmed Death-Ligand 1* / CD274)

PD-L2: Ligando de muerte programada 2 (*Programmed Death-Ligand 2* / CD273)

pg: picogramos

PMN: Polimorfonucleares

PRR: Receptores de Reconocimiento de Patrones

SEM: Error estándar de la media (*Standard Error of the Mean*)

spi: Semanas Post-Infección

SSC-A: Área de dispersión lateral (*Side Scatter Area*)

SSN: Solución Salina Normal

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

TCR: Receptor de Linfocitos T (*T Cell Receptor*)

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante beta

Th1 / Th2: Linfocitos T cooperadoras tipo 1 y tipo 2 (*T helper 1 / 2*)

Th17 / Tc17: Linfocitos T cooperadoras / citotóxicos productores de IL-17

TIM-3: Molécula de dominio de inmunoglobulina y mucina de células T 3

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa

Treg: Linfocitos T reguladores

UANL: Universidad Autónoma de Nuevo León

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

WHA: Asamblea Mundial de la Salud (*World Health Assembly*)

RESUMEN

M.L.H. María Luisa Ruiz de la Cruz

Fecha de graduación: julio del 2026

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con Orientación en Inmunología

Área de estudio: Inmunoterapia en enfermedades infecciosas

Nº de páginas: 163

Introducción: El actinomicetoma es una infección bacteriana crónica, progresiva y desatendida causada principalmente por *N. brasiliensis*. A pesar de inducir una robusta respuesta local dominada por neutrófilos y un microambiente tisular complejo, el patógeno logra persistir. Aunque se ha documentado la presencia de moléculas de coinhibición en el granuloma, el papel funcional de las moléculas PD-1 y PD-L1 en la inmunopatología y cronicidad de esta infección no ha sido completamente esclarecido.

Metodología: Se utilizó un modelo experimental en ratones hembra BALB/c infectados por vía subcutánea en el cojinete plantar con una suspensión unicelular de *N. brasiliensis*. Tras el establecimiento de la fase crónica se cuantificó la expresión de PD-1 en linfocitos T y de PD-L1 en células mieloides mediante citometría de flujo. Posteriormente, se evaluó el efecto del bloqueo terapéutico del eje administrando el anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 atezolizumab en esquemas de una o cuatro dosis semanales. Se evaluaron la evolución clínica, la carga bacteriana, las citocinas séricas, la histopatología, la morfometría de los granos bacterianos y los ensayos de proliferación de linfocitos y adhesión leucocitaria. **Resultados:** El inmunofenotipo inicial demostró una sobreexpresión compartimentalizada de PD-1 en linfocitos CD8⁺ locales y de PD-L1 en neutrófilos infiltrantes en el sitio de la lesión. Contrario a la hipótesis planteada, el bloqueo con atezolizumab incrementó la mortalidad de manera dosis-dependiente, reduciendo la tasa de supervivencia al finalizar las cuatro dosis, desenlace disociado de los cambios macroscópicos del volumen de la lesión. Los ratones tratados con el esquema completo experimentaron un incremento exponencial de la carga bacteriana tisular en comparación con el grupo al que se le administró el vehículo. Histopatológicamente, el bloqueo de PD-L1 disminuyó la compartimentalización granulomatosa homeostática y una remodelación aberrante de los granos bacterianos, los cuales incrementaron significativamente su área, perímetro e índice de esfericidad. A nivel sistémico, el tratamiento indujo una elevación sincrónica dual de IL-12p70 e IL-10. *In vitro*, el bloqueo de PD-L1 disminuyó drásticamente la capacidad de adhesión y anclaje quimiotáctico de los leucocitos estimulados con la bacteria. **Conclusión:** El bloqueo terapéutico de PD-L1 contribuye a la exacerbación de la infección crónica en el actinomicetoma por *N. brasiliensis* en un modelo experimental.



Dr. C. Mario César Salinas Carmona
Director de Tesis

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Infecciones bacterianas crónicas

Las infecciones bacterianas crónicas representan un desafío global debido a su capacidad para persistir durante meses o años en el hospedero, incluso más allá de la fase aguda de la enfermedad, evadiendo al sistema inmune innato y adaptativo y resistiendo los tratamientos convencionales ¹.

Muchas de estas infecciones son causadas por bacterias con capacidad de supervivencia intracelular, lo que les permite ocultarse dentro de células fagocíticas y establecer focos de difícil erradicación, lo que lleva al desarrollo de infecciones crónicas ¹ (Tabla 1. 1. Enfermedades causadas por bacterias intracelulares con potencial de persistencia o cronificación). Ejemplos de ello incluyen enfermedades como la tuberculosis, la brucelosis o la lepra, cuya carga recae desproporcionadamente en regiones con recursos escasos.

A pesar de su relevancia clínica y epidemiológica, estas infecciones crónicas han sido históricamente desatendidas por el sistema de salud. Tal es el caso del actinomicetoma, una enfermedad infecciosa crónica, progresiva y deformante que afecta principalmente a poblaciones rurales de zonas tropicales y subtropicales.

Tabla 1. 1. Enfermedades causadas por bacterias intracelulares con potencial de persistencia o cronificación		
Bacterias intracelulares obligadas		
Infección/Enfermedad	Patógeno	Células diana
Infecciones crónicas por <i>Chlamydia</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Macrófagos, células epiteliales
Fiebre Q crónica	<i>Coxiella burnetii</i>	Osteoclastos, macrófagos, células endoteliales
Enfermedad por arañazo de gato (forma crónica)	<i>Bartonella henselae</i>	Células endoteliales, células estromales mesenquimales, macrófagos
Enfermedad de Whipple	<i>Tropheryma whipplei</i>	Macrófagos, células dendríticas
Bacterias intracelulares facultativas		
Tuberculosis	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Macrófagos, células dendríticas
Lepra	<i>Mycobacterium leprae</i>	Macrófagos, células de Schwann
Fiebre tifoidea (portadores crónicos)	<i>Salmonella spp.</i>	Células epiteliales, células M (microplegadas), macrófagos, células dendríticas, neutrófilos
Listeriosis (forma persistente)	<i>Listeria monocytogenes</i>	Neutrófilos, macrófagos, células parenquimatosas
Brucelosis	<i>Brucella spp.</i>	Macrófagos, células dendríticas, trofoblastos
Tularemia	<i>Francisella tularensis</i>	Macrófagos, monocitos, células dendríticas
Yersiniosis (forma crónica)	<i>Yersinia spp.</i>	Macrófagos, células M, células epiteliales
Shigelosis (portadores crónicos)	<i>Shigella spp.</i>	Células epiteliales colónicas, macrófagos
Melioidosis (latente y reactivación)	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Células epiteliales, macrófagos, neutrófilos
Enfermedad de Lyme	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, células endoteliales
Infección crónica por <i>Mycoplasma</i>	<i>Mycoplasma spp.</i>	Células epiteliales, linfocitos, fibroblastos
Infección por <i>Neisseria</i> (portadores crónicos)	<i>N. gonorrhoeae</i>	Células epiteliales, neutrófilos, células endoteliales
Actinomicetoma	<i>Nocardia brasiliensis</i>	Macrófagos, neutrófilos, células endoteliales

1.2 Micetoma como paradigma de infección bacteriana crónica

La delimitación histórica del reconocimiento del micetoma en los registros de la humanidad sugiere que esta patología ya era identificada por los autores de textos antiguos de la India, quienes la describieron como estructuras similares a hormigueros o pie de hormiguero. No obstante, la primera descripción clínica formal en la literatura médica moderna no ocurrió sino hasta 1842, cuando R. Gill, un cirujano inglés adscrito al dispensario de Madurai, documentó y caracterizó detalladamente la condición dentro de los reportes del Ejército de la India ².

En 1987 se estableció el concepto de micetoma como una infección crónica de la piel y de los tejidos subyacentes (músculos y tendones), con tendencia a afectar los huesos. Se caracteriza por un aumento de volumen relativamente indoloro y fistulas a través de las cuales se elimina pus y granos ³. Estos granos son masas compactas de las colonias del agente causal incrustadas en una matriz extracelular ⁴.

1.3 Epidemiología del micetoma

Desde una perspectiva de salud pública global, el micetoma se ha elevado a una categoría de importancia crítica. En 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo designó oficialmente como una enfermedad tropical desatendida (del inglés, *Neglected Tropical Disease* o NTD) a través de la resolución de la Asamblea Mundial de la Salud (WHA) ^{5,6}.

La designación de enfermedad desatendida reconoce que recibe un financiamiento mínimo para la investigación y el desarrollo de nuevos tratamientos, y que ha sido históricamente pasada por alto por los sistemas de salud nacionales y globales.

1.3.1 Distribución mundial

La frecuencia del micetoma se relaciona estrechamente con el desarrollo socioeconómico de los países donde se presenta, siendo regiones donde existen elevados índices de pobreza y marginación ^{7,8}.

La mayoría de los casos reportados de micetoma provienen de México, Sudán e India y otros países que se encuentran entre las latitudes 30°N y 15°S a nivel mundial (Figura 1. Número de casos reportados de micetoma a nivel mundial) ⁹.

La carga real de la enfermedad a nivel global es desestimada. Esto se debe, en gran medida, a que el micetoma no es una patología de notificación obligatoria, lo que dificulta la obtención de datos precisos sobre su incidencia y prevalencia a nivel mundial. La encuesta realizada en el 2017 para conocer el estatus del micetoma a nivel mundial reveló una baja proporción de países que respondieron, debido a la falta de documentos de consenso o procedimientos para el manejo de casos de micetoma ^{9,10}.

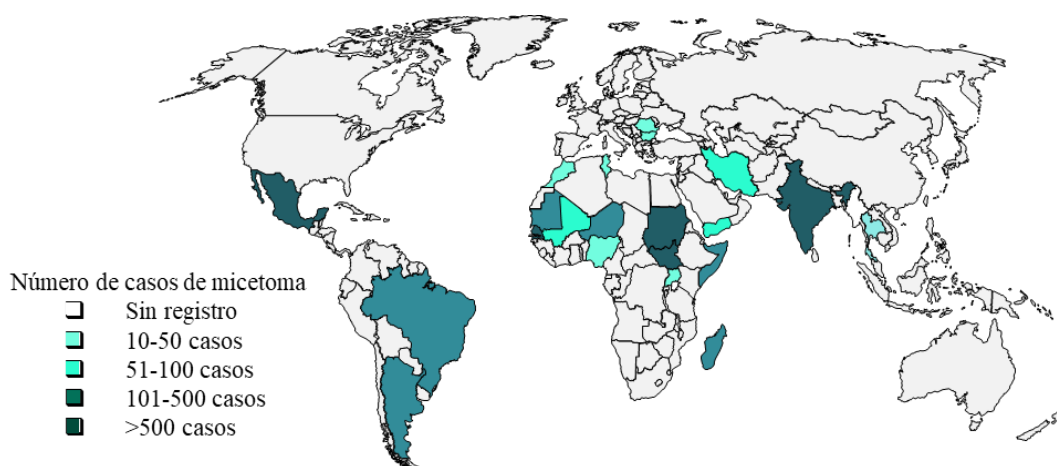


Figura 1. Número de casos reportados de micetoma a nivel mundial
Registro del promedio del número de casos reportados por año por país. Adaptado de van de Sande W, et al, 2013.

1.3.2 Micetoma en México

En México, la ausencia de un sistema de vigilancia epidemiológica dedicado a esta patología implica que los datos disponibles provienen de la revisión de archivos de hospitales o centros de diagnóstico individuales, en lugar de un programa de vigilancia centralizado. Este subregistro hace que las cifras actuales sean una subestimación significativa de la carga real de la enfermedad en nuestro país ⁹.

Los datos epidemiológicos en México se encuentran actualizados hasta el 2013, donde se integra la información obtenida de 11 centros ⁸. En 24 de los 31 estados que conforman la República Mexicana se reportaron 3,933 casos de micetoma de los cuales solo 3,471 reportaron su lugar de origen. Las casuísticas más numerosas correspondieron a: Jalisco (676 casos), Morelos (429), Nuevo León (347), Guerrero (302) y Veracruz (264) ⁸.

En el país, se reporta una frecuencia de 73 casos nuevos por año, de los cuales el 75% son hombres (3:1); la mayor frecuencia de edad se observa entre los 16 y 50 años, un rango que corresponde a la población económicamente activa y productiva laboralmente. Las ocupaciones que registran mayores casos de micetoma son campesinos (58.4%), seguidos de amas de casa en zonas rurales (21.8%) ⁸.

1.4 Mecanismos de transmisión

El micetoma, como forma de infección crónica ¹¹, es el resultado de la introducción directa del patógeno después de un traumatismo menor, comúnmente asociado a actividades como la jardinería, la agricultura, la punción con una espina o una astilla, después de procedimientos quirúrgicos y cosméticos, o como secuela de la infección de la enfermedad diseminada ¹².

A nivel mundial, el micetoma ocurre predominantemente en las extremidades inferiores (79.2 %), seguido de las superiores (6.6 %). En áreas endémicas, también pueden afectarse otras regiones del cuerpo, aunque con menor frecuencia ¹³.

Por ejemplo, en México, las regiones corporales afectadas con mayor frecuencia son las extremidades inferiores (60.3%), seguidas de tronco y extremidades superiores ¹⁴.

La alta prevalencia de lesiones en las extremidades inferiores es una consecuencia directa de este mecanismo de entrada, ya que los pies están en contacto habitual con el suelo y la vegetación ¹⁵.

1.5 Clasificación etiológica

La etiopatogenia del micetoma se basa fundamentalmente en la naturaleza del microorganismo causal, lo que da lugar a dos formas principales de la enfermedad: el eumicetoma (causado por hongos) y el actinomicetoma (causado por bacterias) ^{3,16}. Para los fines del presente trabajo, nos centraremos en esta última forma.

1.6 Actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*

El actinomicetoma tiene su origen en bacterias filamentosas aerobias, denominadas actinomicetos. Los géneros más comunes responsables de esta forma de micetoma son *Nocardia* spp. (*Nocardia brasiliensis*, *Nocardia asteroides* y *Nocardia otidiscaviarum*), *Actinomadura* spp. (*Actinomadura madurae* y *Actinomadura pelletieri*) y *Streptomyces* spp. (*Streptomyces somaliensis*), así como *Actinomyces israeli* ⁵.

De los casos de micetoma reportados en México, el actinomicetoma se presentó en el 96.5%, donde *N. brasiliensis* es el agente causal identificado en el 65.6% de los pacientes ^{14,17}.

N. brasiliensis es una bacteria perteneciente al filo Actinobacteriota, clase Actinomycetes, orden Mycobacteriales y familia Nocardiaceae. Morfológicamente, se presenta como bacilos filamentosos ramificados que tienden a fragmentarse en formas cocoides y bacilares. En la tinción de Gram se comporta como positiva, aunque con tinción débil o variable. Una de sus características más distintivas es su condición de parcialmente ácido-alcohol resistente en la tinción de Ziehl-Neelsen, lo que la diferencia de *Mycobacterium spp.*, que son fuertemente ácido-resistentes ¹⁸⁻²⁰.

Es una bacteria estrictamente aerobia, con temperatura óptima de crecimiento entre 25 y 37 °C. Su hábitat natural es el suelo, la materia orgánica en descomposición, las plantas y el agua, donde vive como saprófito ^{13,15}.

1.7 Desafíos terapéuticos del actinomicetoma

Para finales de los 1960, el trimetoprima-sulfametoxazol se convirtió en el *gold standard* en el tratamiento del actinomicetoma; la dosis diaria recomendada es de 8-40 mg/kg. Se logra una tasa de curación del 60%; sin embargo, es necesario un tratamiento de larga duración ⁵.

La infección primaria por *N. brasiliensis* en forma de micetoma requiere de al menos 12 meses de antibioticoterapia, tiempo que varía dependiendo de la localización y estado inmunológico del paciente, donde la terapia de primera línea es trimetoprima-

sulfametoxazol, y como alternativas están la amikacina, minociclina, imipenem, cefalosporinas de tercera generación y linezolid ^{5,12}.

1.7.1 Resistencia a los antimicrobianos

Recientemente, se han reportado perfiles de resistencia bacteriana para *Nocardia spp.* De un total de 153 aislamientos provenientes de diferentes hospitales de Japón, un total de 14 correspondían a *N. brasiliensis*. De estos, se encontró resistencia hacia los siguientes agentes antimicrobianos: ceftriaxona en el 57%, cefotaxima en el 80%, imipenem en el 86%, ciprofloxacino en el 100% y claritromicina en el 100% ²¹. Otros estudios han reportado resistencia adicional a ampicilina, cefotaxima, ceftriaxona, ciprofloxacino, claritromicina, eritromicina, imipenem y kanamicina. Por el contrario, se ha documentado sensibilidad a amikacina, amoxicilina-ácido clavulánico, carbenicilina, gentamicina, linezolid, sulfametoxazol y tobramicina ^{22,23}.

Debido a esto, crece la necesidad de implementar nuevas estrategias terapéuticas para lograr un adecuado control de la enfermedad, a la vez que se busca evitar el aumento de la resistencia contra los agentes antimicrobianos.

1.7.2 Refractoriedad a la terapia por la naturaleza de la infección

La persistencia de la infección por *N. brasiliensis* no solo se explica por la resistencia antimicrobiana, sino también por las particularidades de la patología.

El micetoma se caracteriza por la formación de granos bacterianos, que contienen microcolonias de bacterias y crean una barrera física que dificulta significativamente la penetración de los fármacos y la acción de los anticuerpos ²⁴. Adicionalmente, la capacidad de la bacteria para sobrevivir y multiplicarse dentro de las células del

hospedero, como los macrófagos, le confiere un mecanismo de evasión de la respuesta inmune ^{25,26}.

En consecuencia, el desarrollo de estrategias terapéuticas que no solo combatan al patógeno, sino que también modulen la respuesta inmune del paciente se vuelve una necesidad crítica para lograr la erradicación completa de la infección y prevenir la recaída.

1.8 Características histológicas del actinomicetoma

La reacción del tejido del hospedero frente a los microorganismos causales del micetoma es característica y se ha clasificado en tres tipos (Figura 2. Tipos de granuloma en el micetoma).

La reacción tipo I se distingue por la presencia de granos rodeados por una capa de leucocitos polimorfonucleares (PMN), con neutrófilos estrechamente adheridos a la superficie del grano o invadiendo su interior. Esta capa celular está, a su vez, rodeada por un infiltrado de células plasmáticas, macrófagos, linfocitos y algunos neutrófilos, dispuestos en un tejido de granulación. Las vénulas y los capilares suelen presentar capas de fibrina en su periferia, mientras que la capa más externa de la lesión está compuesta por tejido fibroso ²⁰.

En la reacción tipo II, los macrófagos y las células gigantes multinucleadas reemplazan a la mayoría de los neutrófilos, observándose con frecuencia fragmentos de granos destruidos en el interior de dichas células gigantes ²⁰.

Finalmente, la reacción tipo III se caracteriza comúnmente por la formación de granulomas epitelioides bien organizados que contienen células gigantes de Langerhans, en los que generalmente no se observan granos ²⁰.

Es fundamental caracterizar los patrones de reacción tisular inducidos por este agente patógeno en el ser humano, que reflejan la complejidad de la respuesta inmunológica del hospedero frente a la infección. Bajo esta perspectiva, el empleo de modelos experimentales, particularmente en roedores, constituye una herramienta indispensable para entender los mecanismos celulares y moleculares de la inmunopatología crónica, lo que permite la extrapolación de dichos hallazgos al contexto clínico de la enfermedad.

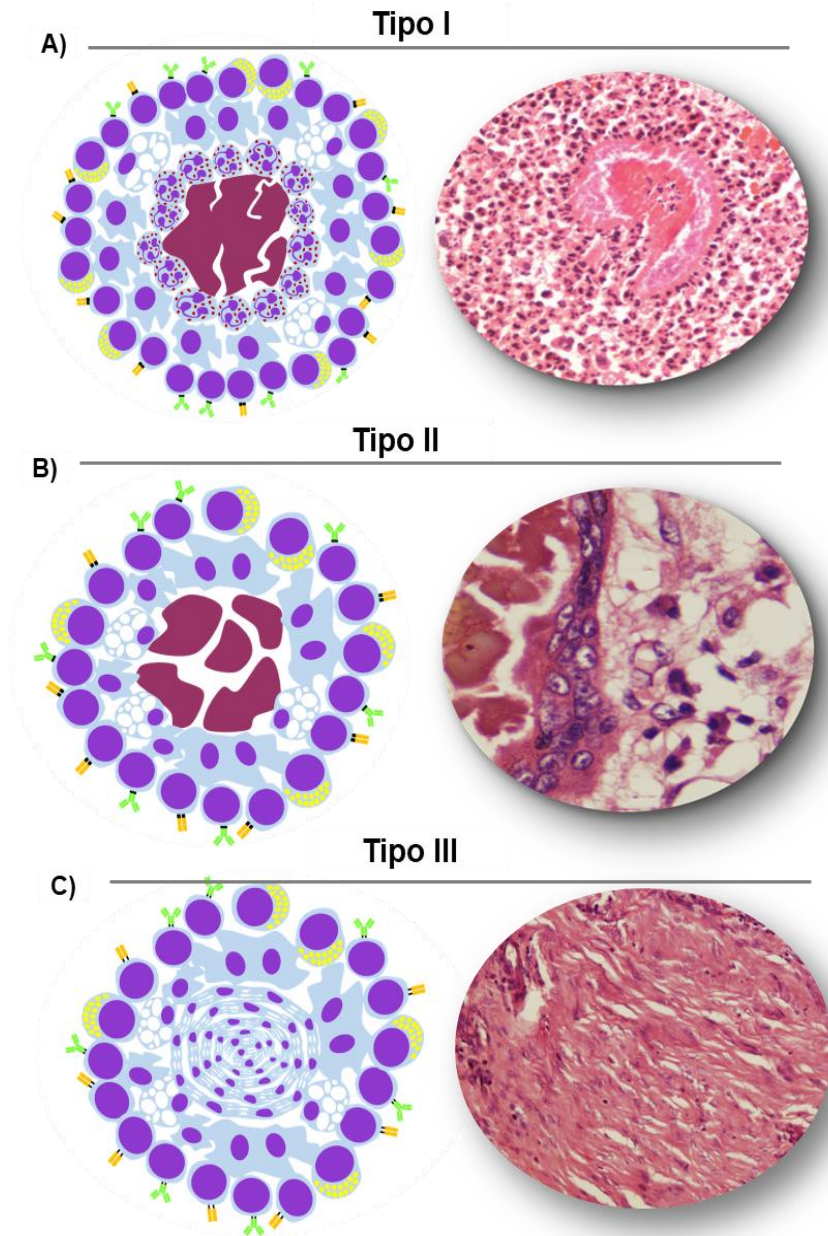


Figura 2. Tipos de granuloma en el micetoma

Izquierda: A) Tipo I: tres zonas celulares alrededor del grano: neutrófilos, macrófagos, células espumosas y linfocitos. B) Tipo II: reemplazo de neutrófilos por macrófagos y células gigantes multinucleadas. C) Tipo III: eliminación del grano, persistiendo un granuloma epiteliode con macrófagos, células gigantes multinucleadas, células espumosas y linfocitos. Izquierda: La representación gráfica fue tomada de Chapman, J, 2021. Derecha: Imágenes tomadas de Zúñiga M, et al., 2015 y Ahmed A, et al., 2017; tinción con hematoxilina y eosina.

1.9 Inmunopatología del actinomicetoma

1.9.1 Cinética de la infección y características histopatológicas generales

El modelo experimental de actinomicetoma en ratones BALB/c, establecido en 1999 por Salinas-Carmona y colaboradores, se basa en la inyección subcutánea de 10^7 unidades formadoras de colonia (UFC) de *N. brasiliensis* en el cojinete plantar de los animales. La inflamación local se hace evidente a partir de las 72 horas post infección y, en aproximadamente el 80% de los ratones, la lesión progresa hacia un actinomicetoma crónico, mientras que el 20% restante logra resolver la infección de manera espontánea después de los 150 días ²⁷.

Desde el punto de vista histopatológico, la etapa aguda (días 3 a 5) se caracteriza por la formación de múltiples microabscesos que contienen microcolonias bacterianas centrales, rasgo distintivo del actinomicetoma ²⁸. Dichos microabscesos están rodeados por abundantes granulocitos PMN que se agrupan en torno a las bacterias; estas últimas aparecen recubiertas de un material eosinofílico hialoideo compuesto por anticuerpos y complemento, como C3 ²⁹. En la periferia de los microabscesos se observa una mezcla de PMN e histiocitos. Hacia el día 14 la lesión entra en un estado estacionario aparente que se mantiene durante aproximadamente una semana ¹⁶.

En este modelo experimental, la lesión actinomicetósica típica, con abscesos, fístulas y destrucción tisular, se establece por completo alrededor del día 28 postinfección y persiste durante 90 días ³⁰; a partir de entonces se inicia un lento proceso de reparación con formación de cicatriz, que culmina con la curación completa hacia el día 150, en los animales que logran resolver la infección ¹⁶.

1.9.2 Respuesta inmune en la fase aguda de la infección

En la fase temprana de la infección se detecta una vigorosa respuesta de anticuerpos dirigida principalmente contra dos antígenos inmunodominantes de *N. brasiliensis*: P61 (una catalasa) y P24 (una proteasa con actividad caseinolítica) ³¹. Los anticuerpos anti-P24 de isotipo inmunoglobulina M (IgM) aparecen ya en el día 7, mientras que la inmunoglobulina G (IgG) alcanza su pico hacia el día 45. La respuesta proliferativa en linfocitos del bazo y ganglios poplíteos también se inicia en el día 7, con un índice de estimulación que declina hacia el día 60 ^{27,32}.

En el suero de los animales infectados se documenta un incremento notable de los niveles de interferón gamma (IFN- γ), más de 10 veces sobre el valor basal, así como aumento de interleucinas (IL) IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) durante la fase aguda de la infección ²⁷. Esta liberación temprana de citocinas pro y antiinflamatorias refleja la activación simultánea de mecanismos efectores y reguladores desde el inicio de la infección.

1.9.3 Respuesta inmune durante la etapa crónica de la infección

1.9.3.1 Infiltrado celular y organización del granuloma

En el estadio crónico, que comprende del día 28 post infección y hasta aproximadamente el día 90, el infiltrado inflamatorio se diversifica y organiza. Si bien los neutrófilos continúan siendo la población leucocitaria dominante, constituyendo más del 90 % de las células infiltrantes³³, en la periferia de los microabscesos se acumulan macrófagos de citoplasma abundante, linfocitos y células plasmáticas. Los abscesos aparecen separados entre sí por capas concéntricas de fibroblastos y tejido conectivo, lo que configura un granuloma crónico activo ³⁴.

Una característica distintiva de esta fase es la presencia de macrófagos espumosos que contienen vacuolas cristalinas, descritas originalmente como “lesión brasiliensis”, ya que estas están ausentes en ratones infectados experimentalmente con *N. asteroides* ¹⁶. Estas células, que también expresan marcadores de células dendríticas (CD11c, CD11b), se generan tanto a partir de macrófagos como de células dendríticas derivadas de la médula ósea y se acumulan en el sitio de la lesión ³⁵. La acumulación de lípidos en estas células refleja una alteración del metabolismo lipídico inducida por la bacteria y contribuye al mantenimiento de un nicho permisivo para su supervivencia intracelular ³⁶.

1.9.3.2 Cinética de la respuesta de citocinas locales y sistémicas durante el actinomicetoma.

Durante la etapa crónica, *N. brasiliensis* modula activamente la respuesta inmune local para generar un microambiente inmunosupresor que favorece su persistencia. La inmunohistoquímica seriada (días 1, 2, 3, 4, 7, 30 y 90 postinfección) ha demostrado que las células productoras de IFN- γ , de IL-4, IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta TGF- β se localizan en la periferia de los microabscesos durante las etapas tardías de la infección ³⁴. La coexpresión de IFN- γ (citocina Th1) e IL-4/IL-10 (citocinas Th2/reguladoras) en el mismo microambiente indica que no existe una polarización neta hacia un perfil T cooperador tipo 1 (Th1) o tipo 2 (Th2), sino más bien una respuesta mixta que la bacteria utiliza en su propio beneficio.

El aumento sostenido de TGF- β 1 y de IL-10 es de particular importancia desde los días 3 hasta el 30 post infección. La IL-10 producida, tanto por linfocitos T reguladores (Treg) como por macrófagos activados, inhibe la función microbicida de los

macrófagos y suprime la producción de IL-12 e IFN- γ . Este mecanismo limita la eliminación intracelular del patógeno, y a la vez suprime la expresión de moléculas coestimuladoras, generando un microambiente de inmunosupresión en el tejido infectado ³⁷. El TGF- β 1, por su parte, promueve la fibrosis y la síntesis de matriz extracelular, lo que contribuye a la encapsulación de los abscesos y a la cronicidad de la lesión ^{34,38}.

La evaluación *in vivo* de la cinética celular y de citocinas tanto en el cojinete plantar (local) como en el bazo (sistémico) reveló un claro desequilibrio en estas poblaciones a lo largo del curso de la infección.

En la fase temprana, específicamente a los 3 días post infección, se detectó un incremento significativo de linfocitos Th17 y Tc17 (CD4+y CD8+productores de IL-17) en ambos compartimentos anatómicos, respuesta que coincide temporalmente con niveles máximos de IL-6 e IL-23, que son citocinas clave en la diferenciación hacia el fenotipo Th17 ³⁹.

La IL-17 producida por estas células desempeña un papel fundamental en el reclutamiento masivo de neutrófilos hacia el sitio de la lesión, fenómeno histopatológico característico de la etapa aguda del actinomicetoma ⁴⁰.

Esta expansión secuencial de Treg se correlacionó de manera directa con una elevación sostenida de TGF- β 1, detectable desde el día 3 y mantenida hasta el día 30, así como con la presencia continua de IL-10 durante todo el curso de la infección, en comparación con los ratones no infectados ³⁹. El TGF- β 1, en particular, desempeña un papel dual de gran relevancia en este modelo: durante la fase temprana, en presencia

de IL-6, promueve la diferenciación de linfocitos Th17, mientras que posteriormente, en ausencia de señales proinflamatorias, favorece la diferenciación y el mantenimiento de las células Treg Foxp3⁺, que terminan por dominar el microambiente durante la etapa crónica ³⁸.

Finalmente, en lo que respecta a la evolución hacia la cronicidad, se documentó que las citocinas proinflamatorias IFN- γ , IL-17A e IL-23 alcanzaron su pico máximo alrededor del día 15, coincidiendo con una reducción transitoria de la carga bacteriana, no obstante, en la etapa crónica (días 30 a 60) la producción de IFN- γ decayó de manera significativa, mientras que la expresión de citocinas antiinflamatorias y la carga bacteriana se incrementaron nuevamente ³⁹.

1.9.3.3 Inmunomodulación por componentes bacterianos

Los lípidos de la pared celular de *N. brasiliensis* desempeñan un papel central en la modulación de la respuesta inmune. Experimentos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que estos lípidos aumentan la producción de IL-6 por macrófagos, así como el índice fagocítico, inhibiendo la presentación antigénica y favoreciendo un entorno permisivo para la supervivencia bacteriana, así como un ambiente proinflamatorio inespecífico ³⁶. Asimismo, la bacteria produce moléculas inmunosupresoras como la brasilicardina A, que interfiere con la activación de la inmunidad innata y adaptativa ^{41,42}.

1.10 Puntos de control de la respuesta inmune: el paradigma del agotamiento de las células T

El concepto de agotamiento de células T se define como un estado de disfunción celular progresivo, caracterizado por la regulación negativa de las funciones efectoras: la

producción de IL-2, la capacidad proliferativa, la secreción de TNF- α y, en última instancia, la de IFN- γ . Esto se acompaña de la expresión sostenida de múltiples receptores inhibidores (Figura 3. Señales coestimuladoras y coinhibidoras en los linfocitos y las células presentadoras de antígeno), denominados puntos de control inmune ⁴³⁻⁴⁵.

PD-1 o Programmed death 1 (CD279) es un receptor inhibidor inducible expresado en linfocitos T y B activados periféricamente, regula la tolerancia y la autoinmunidad. PD-1 tiene dos ligandos: el ligando 1 de PD-1 (PD-L1 o CD274), que se expresa ampliamente en las células hematopoyéticas (linfocitos T, B, macrófagos y células dendríticas) y parenquimatosas, incluidas las células de los islotes pancreáticos y endotelio vascular; y PD-L2 (CD273), que está restringido a macrófagos y células dendríticas ⁴⁶. Otros ejemplos de puntos de control inmune en los linfocitos T son el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) y la molécula 3 de dominio de inmunoglobulina y mucina de células T (TIM-3), cuya coexpresión define grados crecientes de deterioro funcional linfoide.

En 1987, Brunet y colaboradores describieron por primera vez las moléculas coinhibidoras o puntos de control inmune, y estudiaron la molécula CTLA-4 ⁴⁷. Sin embargo, su función no fue dilucidada hasta que Krummel y Allison descubrieron que esta molécula actúa como un freno en la activación de los linfocitos T, al unirse a las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 presentes en las células presentadoras de antígeno (CPA) ⁴⁸. Posteriormente, en 1999, Ishida y colaboradores describieron PD-1 y demostraron que actúa como un regulador negativo de la respuesta de los linfocitos T al interactuar con su ligando PD-L1, lo que reduce la señalización a través del

receptor de linfocitos T (TCR) e interfiere con la activación de estas células ⁴⁹. Iwai y colaboradores también demostraron que el bloqueo de PD-1 y PD-L1 mediante anticuerpos monoclonales constituye una estrategia prometedora para combatir el cáncer en modelos animales ⁵⁰.

Este hallazgo sugirió el uso de PD-1 como diana terapéutica en la inmunoterapia de pacientes con cáncer, y estimuló una intensa investigación a nivel mundial en ensayos clínicos orientados a tratar diversas formas de cáncer mediante la ruptura de la tolerancia de los linfocitos T hacia los antígenos tumorales.

En el contexto de las infecciones bacterianas crónicas, y de manera particular en la tuberculosis causada por *M. tuberculosis*, este paradigma ha sido objeto de una profunda reinterpretación.

La evidencia acumulada en modelos animales y en estudios clínicos ha revelado lo que algunos autores han denominado la paradoja del agotamiento inmune ^{37,51}, a diferencia de lo observado en el cáncer ⁵² o en las infecciones virales persistentes ^{53–56}. La expresión de moléculas coinhibidoras en el microambiente de la infección bacteriana no siempre constituye un marcador de agotamiento terminal del linfocito T, sino que, en determinadas circunstancias, puede representar un mecanismo orientado a proteger al hospedero de las consecuencias patológicas de una respuesta inflamatoria exacerbada y sostenida ⁵⁷.

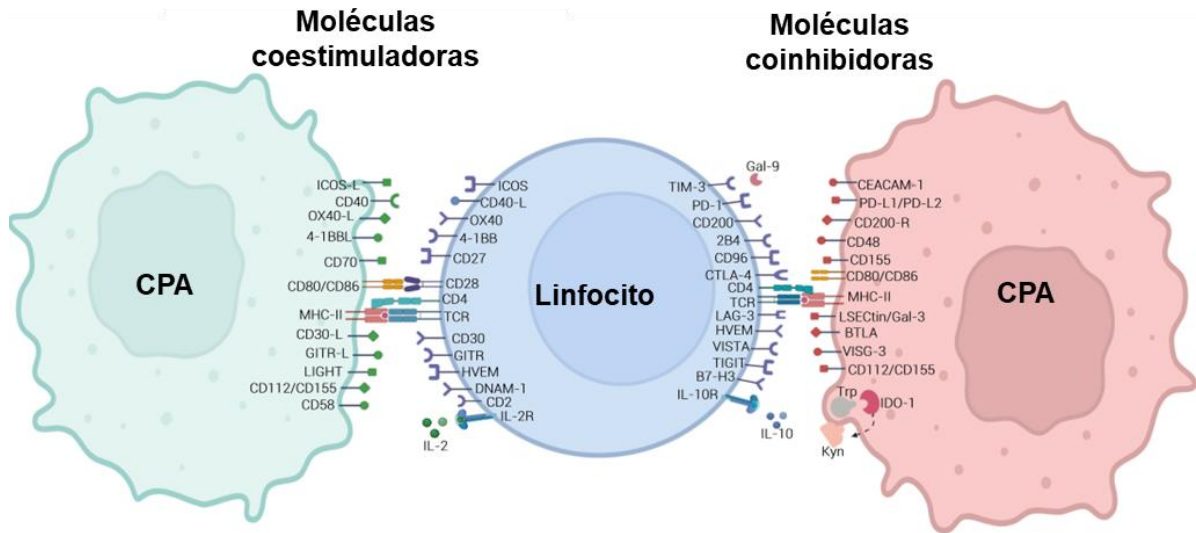


Figura 3. Señales coestimuladoras y coinhibidoras en los linfocitos y las células presentadoras de antígeno

Izquierda: Las moléculas coestimuladoras en los linfocitos T, como ICOS, CD40-L, OX40, 4-1BB, CD27, CD30, GITR y HVEM, cuando interactúan con sus ligandos en las células presentadoras de antígeno (CPA), como ICOS-L, CD40, OX40-L, 4-1BBL, CD30-L, GITR-L y LIGHT, proporcionan señales positivas que contribuyen a la proliferación de los linfocitos T y a sus funciones efectoras. Derecha: Las moléculas coinhibidoras en los linfocitos T, ejemplificadas por TIM-3, PD-1, 2B4, CTLA-4, LAG-3, HVEM, VISTA y TIGIT, actúan como puntos de control para modular las respuestas inmunitarias al interactuar con sus ligandos CEACAM-1, PD-L1, PD-L2, CD48, CD80, CD86, MHC-II o LSECtin/Gal-3, BTLA, VISG-3 y CD112 o CD155 en las CPA. Las interacciones entre las moléculas coinhibidoras y sus ligandos contribuyen a la regulación de la activación inmunitaria, previniendo respuestas excesivas y manteniendo la homeostasis inmunitaria. La representación gráfica de las células y sus receptores fue elaborada con Biorender <https://www.biorender.com/>.

1.10.1 Mecanismos moleculares de la modulación por puntos de control inmune

La activación de los linfocitos T requiere la integración de al menos tres tipos de señales: el reconocimiento del complejo péptido antigénico - complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) por el receptor de células T (TCR), las señales coestimuladoras proporcionadas por moléculas como CD28, y las citocinas presentes

en el microambiente (Figura 4. La activación, diferenciación y mecanismos efectoros de los linfocitos T cooperadores (CD4+) y citotóxicos (CD8+)) ³⁷.

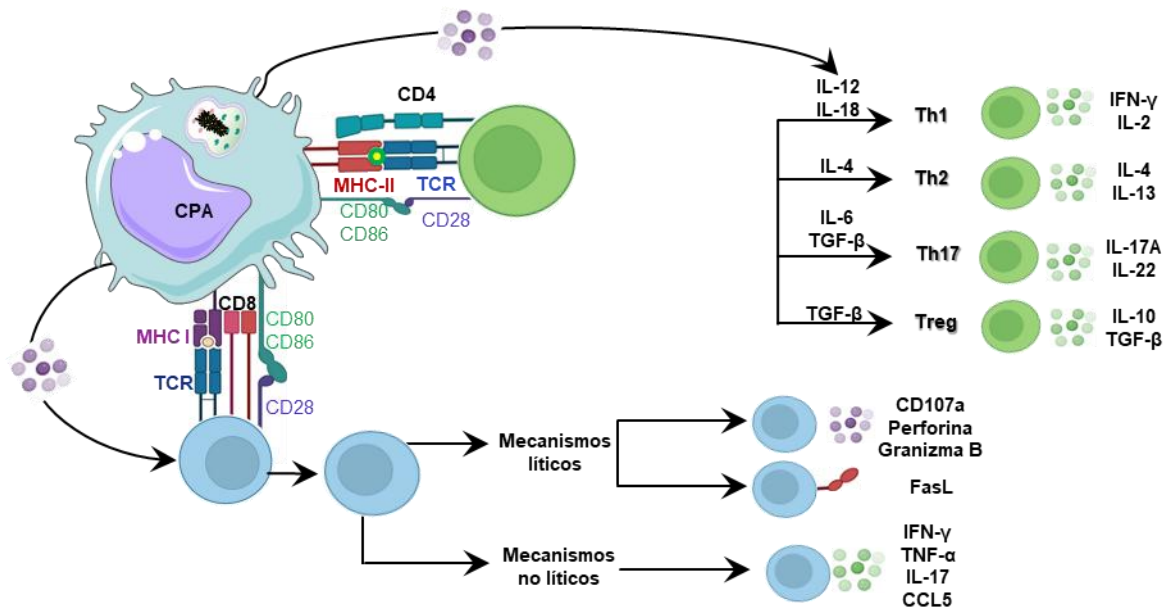


Figura 4. La activación, diferenciación y mecanismos efectoros de los linfocitos T cooperadores (CD4+) y citotóxicos (CD8+)

El inicio de la respuesta inmune adaptativa celular requiere la interacción entre una célula presentadora de antígeno (CPA) y los linfocitos T *naive*. El reconocimiento antigénico ocurre mediante el acoplamiento del receptor de célula T (TCR) con el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) para los linfocitos CD4+ o de clase I (MHC-I) para los linfocitos CD8+. La coestimulación está mediada por la unión de las moléculas CD80/CD86 en la CPA con el receptor CD28 en el linfocito T. Dependiendo del perfil de citocinas presentes en el microambiente durante la sinapsis inmunológica, los linfocitos CD4+ se polarizan hacia distintos linajes efectoros: Th1 (inducido por IL-12 e IL-18; productor de IFN- γ e IL-2), Th2 (inducido por IL-4; productor de IL-4 e IL-13), Th17 (inducido por IL-6 y TGF- β ; productor de IL-17A e IL-22) o Treg (inducido por TGF- β ; productor de IL-10 y TGF- β). Por su parte, los linfocitos CD8+ activados ejecutan funciones efectoras a través de mecanismos líticos, que incluyen la degranulación de perforina, granzima B y la expresión de CD107a, así como la vía Fas/FasL; y mecanismos no líticos mediante la secreción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-17 y CCL5. La representación gráfica de las células fue elaborada con Smart servier <https://smart.servier.com/>.

PD-1 ejerce su acción inhibitoria predominantemente en los tejidos periféricos. La interacción de PD-1 con su ligando PD-L1 recluta fosfatasas, como SHP2, hacia sus dominios citoplasmáticos ITIM e ITSM, lo que reduce la señalización del TCR. Esto disminuye la activación de factores de transcripción como factor nuclear kappa B (NF- κ B), esenciales para la proliferación, supervivencia y función efectora del linfocito T. Adicionalmente, la señalización a través de PD-1 induce la expresión del factor de transcripción BATF, que reprograma metabólicamente a la célula T hacia un estado de menor capacidad de respuesta (Figura 5. Vías de activación e inhibición en células T CD4+ y células presentadoras de antígeno) ^{52,58}.

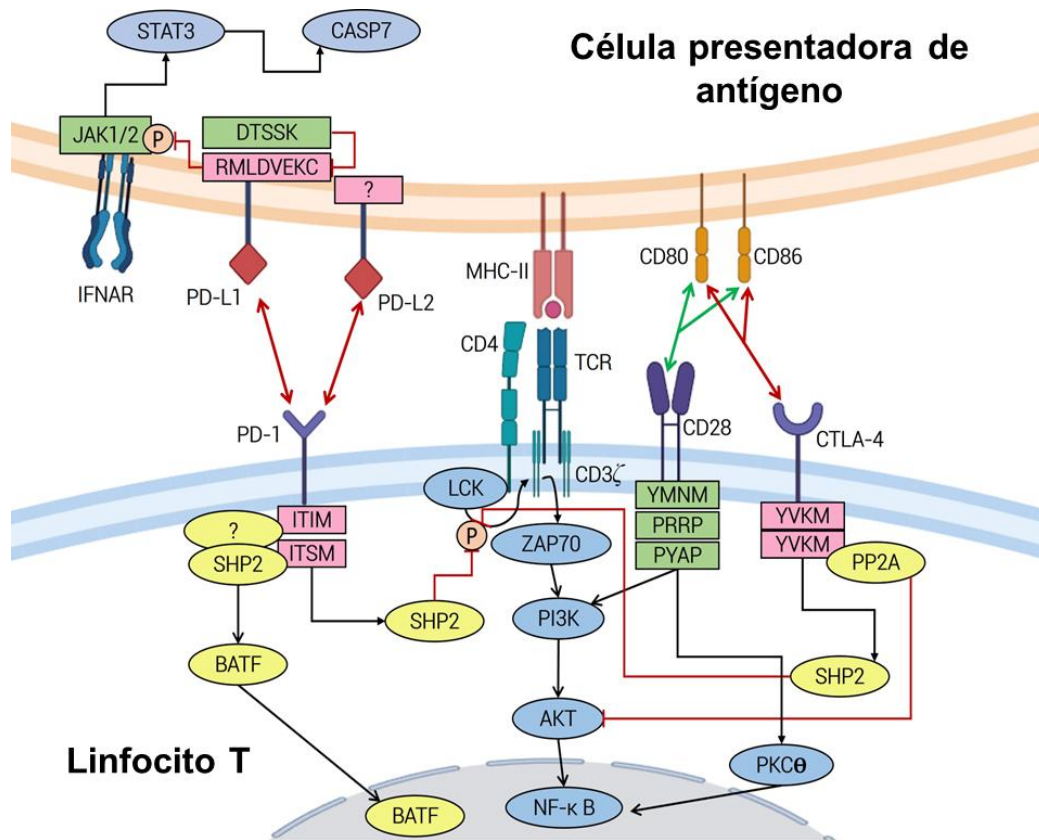


Figura 5. Vías de activación e inhibición en células T CD4+ y células presentadoras de antígeno

Las vías de señalización de activación de los linfocitos T, desencadenadas por el TCR (que interactúa con MHC-II) y por CD28 (que interactúa con CD80 y/o CD86), pueden ser contrarrestadas por la señalización de PD-1 y CTLA-4, las cuales reclutan fosfatasas. CTLA-4 puede unirse a CD80 o CD86, reclutando las fosfatasas SHP2 y PP2A a través del motivo YVKM en su dominio citoplasmático. El reclutamiento de SHP2 resulta en la atenuación de la señalización del TCR mediante la desfosforilación de la cadena CD3 ζ . El reclutamiento de PP2A resulta en la desfosforilación descendente de AKT. La unión de PD-1 a PD-L1 o PD-L2 también recluta SHP2 al dominio ITSM, lo que produce reducciones proximales a la membrana en la señalización del TCR. PD-1 puede inhibir las funciones de los linfocitos T reclutando fosfatasas al motivo de conmutación basado en tirosina inmunorreceptor (ITSM) en la porción intracelular de PD-1. En conjunto, esto se traduce en una disminución de la activación de factores de transcripción, como el factor nuclear κ B (NF- κ B), que son importantes para impulsar la activación, proliferación, funciones efectoras y supervivencia de los linfocitos T. Además, PD-1 puede inhibir las funciones de los linfocitos T al aumentar la expresión de factores de transcripción como BATF, lo que puede contrarrestar aún más los programas efectoras transcripcionales. En las CPA, la unión de PD-L1 puede contrarrestar la apoptosis inducida por interferón, con su motivo

RMLDVEKC inhibiendo la fosforilación de STAT3. Se ha demostrado que el motivo DTSSK inhibe su motivo contiguo actuando como un regulador negativo. La representación gráfica de las células y receptores fue elaborada con Biorender <https://www.biorender.com/>.

En el contexto de las infecciones por bacterias intracelulares, el reconocimiento del patógeno por parte del hospedero se inicia a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los receptores tipo Toll (TLR), localizados en la membrana plasmática o en compartimentos endosomales. La unión de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) a estos receptores desencadena la oligomerización de la proteína adaptadora MyD88, activando las vías de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y NF- κ B, lo que conduce a la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α) y quimiocinas (proteína quimiotáctica de monocitos 1 o MCP-1, proteína inflamatoria de macrófagos MIP-2, CXCL10). Esta respuesta contribuye a la polarización de macrófagos hacia un fenotipo proinflamatorio y al incremento de la expresión de moléculas MHC y coestimuladoras.

Un aspecto relevante para el presente trabajo es que las bacterias intracelulares han desarrollado mecanismos para modular la expresión de receptores de superficie celular, incluyendo PD-L1, como parte de su estrategia de evasión inmune. Esta modulación, junto con la inhibición de la fagocitosis, la polarización hacia un fenotipo antiinflamatorio y la alteración de la presentación antigénica a través del MHC ⁵⁹, permite que el patógeno persista dentro del hospedero.

Para identificar nuevas dianas terapéuticas, más allá de la antibioticoterapia convencional, es fundamental comprender las vías de interacción hospedero-patógeno

y ampliar el estudio de moléculas coinhibidoras como PD-1/PD-L1 en modelos experimentales de infección crónica por bacterias.

1.10.2 El papel protector de los puntos de control inmunitario en infecciones bacterianas crónicas

En la tuberculosis, que constituye el ejemplo de infección bacteriana con mayor número de estudios sobre puntos de control inmune, la formación del granuloma representa el evento central de su inmunopatología.

Desde la descripción morfológica de la tuberculosis pulmonar como una lesión parenquimatosa granulomatosa, denominada como complejo de Ghon, se ha establecido al granuloma pulmonar como el sello distintivo de esta enfermedad ^{60,61}. Su morfología se caracteriza por un núcleo central necrótico rodeado por capas concéntricas de macrófagos, células epitelioides, células gigantes multinucleadas de Langhans y linfocitos ⁶⁰.

De esta manera, el confinamiento de *Mycobacterium tuberculosis* en el sitio de infección primaria mediante una barrera celular y una capa externa fibrótica impide la diseminación del patógeno a través del hospedero y focaliza la respuesta inmune en el lugar de persistencia micobacteriana. Por lo tanto, esta estructura organizada permite contener la diseminación de las micobacterias, pero al mismo tiempo genera un nicho anatómico y funcional donde el patógeno puede persistir durante largos períodos ⁶⁰⁻⁶².

La evidencia experimental indica que las moléculas coinhibidoras desempeñan un papel crucial en el control de la inflamación dentro de este nicho. Así, en modelos experimentales de infección por *M. tuberculosis*, la ausencia de PD-1 o de sus ligandos

(PD-L1 y PD-L2) no conduce a una mejor eliminación bacteriana, sino que desencadena una inflamación descontrolada, con infiltración masiva de neutrófilos, daño tisular pulmonar severo y muerte acelerada del animal ⁶³⁻⁶⁵. Este hallazgo sugiere que la señalización a través del eje PD-1/PD-L1 actúa como un freno inmunológico indispensable para prevenir la inmunopatología letal mediada por células, sin comprometer de forma irreversible la capacidad de respuesta del hospedero.

De hecho, las células T que expresan PD-1 en el sitio de la infección tuberculosa conservan con frecuencia sus fenotipos efectores y de memoria, y mantienen la capacidad de proliferar tras la reestimulación antigénica^{64,65}, lo cual refuerza la noción de que no se encuentran auténticamente agotadas en el sentido clásico del término.

1.10.3 Dinámica de los puntos de control y las citocinas en la infección bacteriana crónica

La relación entre el microambiente de citocinas y la expresión de moléculas coinhibidoras es bidireccional y compleja. En la infección por *M. tuberculosis*, la IL-12 promueve la expresión de PD-1 ⁶⁶, pero al mismo tiempo preserva el fenotipo de las células T de memoria ^{67,68} y efectoras ⁶⁸⁻⁷⁰, así como la producción de IFN- γ ⁶⁶, lo que permite mantener un control de la inflamación sin una pérdida completa de la efectividad de la respuesta inmune tipo Th1. El IFN- γ , por su parte, regula al alza la expresión de PD-L1 en las CPA ^{71,72}, estableciendo un circuito de retroalimentación negativa local que limita el daño tisular perigranulomatoso.

Sin embargo, es importante señalar que el bloqueo del eje coinhibidor PD-1/PD-L1 con anticuerpos monoclonales puede inducir la regulación al alza de otros puntos de control

inmune, como CTLA-4 o el gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3), como un mecanismo compensatorio atribuible a la redundancia biológica de estas vías ⁶⁴.

Este hallazgo implica que, durante la infección bacteriana crónica, las moléculas coinhibidoras pueden funcionar como un freno para detener una respuesta inmune exacerbada, y que probablemente se requiera la expresión de múltiples receptores inhibidores en la superficie de los linfocitos T para alcanzar un estado de agotamiento funcional que limite la capacidad efectora.

1.10.4 Papel de las células mieloides y los puntos de control inmune en los nichos inmunosupresores del granuloma y el grano actinomicótico.

La organización arquitectónica de las lesiones características en las infecciones bacterianas crónicas es un determinante fundamental de la función inmunitaria. En la tuberculosis humana, se ha caracterizado el núcleo mieloide del granuloma como un entorno profundamente inmunosupresor ⁷³.

El control de *M. tuberculosis* depende principalmente de los mecanismos bactericidas desencadenados por macrófagos activados con fenotipo M1.⁷⁴ Sin embargo, en el microambiente del granuloma también están presentes otras células mieloides, como neutrófilos, macrófagos M2, macrófagos espumosos y mastocitos, todas las cuales pueden expresar los ligandos de las moléculas coinhibidoras de los linfocitos T, en respuesta a estímulos crónicos proinflamatorios, destacando PD-L1 ^{70,73,75-78}.

De manera notable, investigaciones recientes en pacientes con micetoma han identificado una organización espacial paralela. Independientemente de la naturaleza bacteriana o fúngica del agente causal, las células fagocíticas, principalmente

neutrófilos, que se localizan en proximidad inmediata a los granos, expresan niveles elevados de moléculas asociadas con la inmunosupresión, entre ellas PD-L2 ⁷⁹. Este hallazgo sugiere que el grano del micetoma, al igual que el granuloma tuberculoso, establece un nicho inmunosupresor evolutivamente conservado que protege al patógeno de la respuesta citotóxica del hospedero.

La presencia de neutrófilos con fenotipo supresor en la periferia del grano constituye una característica compartida con el granuloma por *M. tuberculosis* y el microambiente tumoral, lo que ha llevado a plantear la posibilidad de aplicar estrategias de inmunoterapia oncológica, como el bloqueo de puntos de control, para el tratamiento de estas infecciones crónicas.

1.11 Terapias con inhibidores de puntos de control en infecciones crónicas

El éxito de los inhibidores de puntos de control inmunológico (ICI) en el tratamiento de diversas neoplasias ha impulsado su evaluación como posible estrategia terapéutica en el contexto de las infecciones crónicas. Sin embargo, a diferencia de lo observado en oncología, donde el bloqueo de PD-1/PD-L1 restaura la actividad antitumoral de los linfocitos T, en las infecciones crónicas los resultados han sido variables y dependientes del patógeno, del momento de la intervención y del modelo experimental empleado.

1.11.1 Validación del uso de anticuerpos monoclonales como inhibidores de punto de control en modelos animales

Para evaluar las moléculas diseñadas y aprobadas por la FDA (*Food and Drug Administration*) con efectos terapéuticos anti-PD-L1, se realizaron diversos ensayos,

entre ellos uno de coimmunoprecipitación donde *mPD-L1* (murino) o *hPD-L1* (humano) fueron precipitados con perlas recubiertas con los anticuerpos monoclonales humanizados durvalumab o atezolizumab, o con el control positivo anti-PD-L1 MIH5 murino, donde sólo el atezolizumab tuvo la capacidad de unirse a *mPD-L1* al igual que el control positivo ⁸⁰.

Con la finalidad de validar la eficacia de los anticuerpos monoclonales antes mencionados en ratones, se realizó un modelo de crecimiento tumoral con la cepa C57BL/6, que fueron implantados de forma subcutánea con células MC38. Los anticuerpos terapéuticos, atezolizumab y durvalumab, así como el anticuerpo control anti-PD-L1 de ratón clon 10F.9G2, se inyectaron por vía intraperitoneal.

Se evaluó el crecimiento de la lesión y se encontró que no hubo un aumento importante del volumen tumoral durante el tratamiento con atezolizumab, al igual que con la administración del anticuerpo monoclonal anti-*mPD-L1* ⁸⁰.

En un estudio similar realizado con ratones BALB/c inyectados con células A2780cis vía subcutánea, se les administró el anticuerpo monoclonal atezolizumab, solo o en combinación con bevacizumab, para observar cambios en la masa tumoral a los siete días de desarrollo. Se encontró una reducción de la masa tumoral con respecto al control con la administración individual de atezolizumab ⁸¹.

Se evaluó la inmunogenicidad de atezolizumab, demostrando títulos altos de anticuerpos antidroga (AAD) en un Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA) indirecto, sólo cuando fue administrado en conjunto el adyuvante incompleto de Freund y la posterior administración con el adyuvante incompleto ⁸².

La cinética de AAD específicos contra atezolizumab fue evaluada en ratones C57BL/6, encontrando un aumento de AAD dependiente de la dosis administrada vía intravenosa, siendo mayor en el esquema de 10 mg/kg en comparación con 50 mg/kg. Sin embargo, las concentraciones séricas de atezolizumab cayeron rápidamente después de la tercera dosis, lo que se correlacionó con la presencia de AAD; estos resultados también se observaron en monos *Cynomolgus* ⁸³.

1.11.2 Evidencia del bloqueo de PD-1 y PD-L1 en infecciones virales, fúngicas y parasitarias

En modelos animales de infección viral crónica, como el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) en ratones, la ausencia o inhibición del eje PD-1/PD-L1 ha demostrado restaurar la función de las células T CD8⁺, reducir la carga viral y mejorar el control de la infección ^{53,84}; resultados similares se encontraron en un modelo murino de mucormicosis pulmonar por *Rhizopus arrhizus* ⁸⁵, donde se elevaron citocinas proinflamatorias en el tejido pulmonar sin toxicidad hiperinflamatoria.

De forma contraria, en modelos murino se ha reportado que la presencia del eje PD-1/PD-L1 confiere mayor resistencia frente a infecciones por *Toxoplasma gondii* ⁸⁶, *Trypanosoma cruzi* ^{87,88} y *Plasmodium spp.* ⁸⁹. En estos casos, la potenciación de la respuesta inmune adaptativa de células T no promovió el control de la infección en el hospedero.

1.11.3 Evidencia del bloqueo de PD-1 y PD-L1 en infecciones bacterianas

Como ejemplo de infección bacteriana aguda, en un modelo de sepsis establecido mediante ligadura y punción cecal en ratones C57BL/6, se observó un aumento de linfocitos T y B y de monocitos que expresaban PD-1, así como un incremento de la

expresión de PD-L1 en células B y monocitos. Se administró una dosis de anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 por vía intraperitoneal, 24 horas antes de la cirugía. En este grupo se observó una sobrevida mayor a las 24 horas posinfección en comparación con el grupo control tratado con solución salina o con un anticuerpo isotipo. La expresión de TNF- α e IL-6 aumentó en el grupo de ratones tratados con el anticuerpo anti-PD-L1, así como la disminución de IL-10. También se observó una disminución en la carga bacteriana ⁹⁰.

En otro modelo de sepsis por ligadura y punción cecal en ratones C57BL/6 fueron tratados con atezolizumab, anticuerpo monoclonal humanizado, administrando vía intraperitoneal post cirugía. En el grupo control se encontró un aumento de la expresión de PD-1 en neutrófilos. En los animales que se administró atezolizumab el aumento de la concentración de endotoxinas y el aumento de la permeabilidad intestinal era menor en comparación con el grupo control. De igual forma, el tratamiento tuvo la capacidad de mantener la integridad de las proteínas de las uniones estrechas del intestino, como claudina-1, ocludina, zona ocludens-1; además, observó un aumento en la sobrevida a las 120 horas ⁹¹.

Para el presente trabajo, el caso de la tuberculosis como infección crónica es particularmente relevante e ilustrativo. Los primeros indicios sobre el papel de PD-1 en esta infección provinieron de estudios con ratones deficientes en este receptor (PD-1^{-/-}), los cuales mostraron una mortalidad acelerada tras la infección por *M. tuberculosis* en comparación con los animales de cepa silvestre (o *wild type*), debido a una producción excesiva de IFN- γ por parte de los linfocitos T CD4+ ⁹².

La evidencia más contundente proviene de estudios en macacos rhesus (*Macaca mulatta*), considerados el estándar en modelos preclínicos de oro por su capacidad de replicar fielmente la patogenia y la respuesta inmune de la tuberculosis humana. Los animales fueron tratados con un anticuerpo monoclonal anti-PD-1 humanizado (clon EH12) a una dosis de 10 mg/kg por vía intravenosa, administrada en las semanas 2, 4, 6, 8, 10 y 13 post-infección ⁶⁴.

Los resultados mostraron que, contrario a lo esperado, el bloqueo de PD-1 exacerbó la infección. Los macacos tratados con anti-PD-1 desarrollaron una enfermedad más grave, con granulomas de mayor tamaño y un aumento de aproximadamente 20 veces en la carga bacteriana en comparación con los animales control tratados con anticuerpo isotipo. Además, uno de los seis animales tratados presentó síntomas agudos y fue sacrificado de forma temprana.

En cuanto a la respuesta de linfocitos T, el bloqueo de PD-1 aumentó el número y la funcionalidad de las células T CD8+ específicas de *M. tuberculosis* en los granulomas, con una mayor producción de IFN- γ , IL-2 y granzima B.

Sin embargo, las células T CD4+ específicas no mostraron aumento en número o función; por el contrario, su acumulación en las vías respiratorias se retrasó, expresando niveles elevados de CTLA-4, además de una movilidad reducida dentro de los granulomas en estudios de imagen en tiempo real ⁶⁴.

1.12 Perspectivas para el actinomicetoma por *N. brasiliensis*

A diferencia de la tuberculosis, no existen estudios publicados sobre el papel de los puntos de control inmunológico en el actinomicetoma ni en la infección por *N.*

brasiliensis. Esta bacteria intracelular facultativa, causante de una infección crónica localizada en piel y tejidos blandos, comparte con *M. tuberculosis* la capacidad de inducir granulomas y evadir la respuesta inmune mediante la persistencia intracelular³⁶.

Sin embargo, el micetoma se caracteriza por una respuesta predominantemente neutrofílica y la formación de granos bacterianos, aspectos que podrían modular de manera distinta el efecto del bloqueo de PD-L1.

Dado que en la tuberculosis el bloqueo de esta vía resultó deletéreo, y considerando que *N. brasiliensis* pertenece al mismo filo que *M. tuberculosis* (Actinobacteria) y comparte características de patogenicidad intracelular, resulta imperativo evaluar experimentalmente si el bloqueo de PD-L1 en el modelo murino de actinomicetoma reproduce el fenotipo de exacerbación observado o si, por el contrario, ofrece algún beneficio terapéutico. Los hallazgos de este estudio podrían sentar las bases para futuras estrategias de inmunoterapia dirigida en micetoma y otras infecciones crónicas por actinobacterias.

2 ANTECEDENTES

En el modelo de actinomicetoma por *N. brasiliensis* ²⁷, se ha descrito la coexistencia de una tríada inmunopatológica: una respuesta sistémica robusta, una inmunosupresión local aumentada y una eficiente evasión bacteriana activa.

A nivel sistémico, se observa la expansión de linfocitos T, la producción de IFN- γ y la generación de anticuerpos específicos. En contraste, el microambiente tisular local del cojinete plantar se caracteriza por la inmunosupresión, con el incremento de las citocinas IL-10 y TGF- β 1, así como la acumulación de neutrófilos, linfocitos Treg y macrófagos espumosos, los cuales inhiben la respuesta de perfil Th1. El patógeno aprovecha activamente esta disociación inmunológica mediante mecanismos de resistencia antimicrobiana, la modificación del metabolismo lipídico del hospedero y la inducción de fibrosis.

Esta configuración inmunopatológica proporciona el sustrato biológico para la instauración de fenómenos de disfunción celular. Este fenómeno se asocia directamente con el agotamiento de las células T efectoras ⁹³. Actualmente, se desconoce el mecanismo por el cual se revierte el control de la infección al establecerse la fase crónica, por lo que se propone como mecanismo el agotamiento de los linfocitos T, que pierden su capacidad efectora al ser estimuladas de manera constante y prolongada por los antígenos de *N. brasiliensis*; esto resulta en la expresión de moléculas inhibitoras y perdiendo su capacidad efectora.

En el modelo de estudio, se ha documentado que las poblaciones de linfocitos T expresan moléculas de agotamiento como PD-1 y TIM-3 ⁹⁴. Por lo tanto, resulta necesario caracterizar las células infectadas presentes durante la fase crónica,

determinar si expresan el ligando PD-L1 y evaluar el control de la infección tras el bloqueo del eje PD-1/PD-L1, con el objetivo de comprender su impacto en el establecimiento y la perpetuación de la etapa crónica de la infección.

3 JUSTIFICACIÓN

En el modelo experimental de actinomicetoma inducido por *N. brasiliensis*, se ha identificado la expresión de la molécula coinhibidora PD-1, por lo que es necesario demostrar la presencia de su ligando y estudiar el efecto de la inhibición del eje PD-1/PD-L1 mediante el uso de anticuerpos monoclonales.

Esto permitirá comprender la función de estas moléculas en la regulación del sistema inmune durante infecciones bacterianas crónicas, además de ofrecer un enfoque terapéutico innovador.

4 HIPÓTESIS

El uso de un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 permite el control de la infección crónica en el actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* en un modelo experimental.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del bloqueo de PD-L1 en la progresión del actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*.

5.2 Objetivos específicos

- 1) Evaluar la inmunopatología local en el actinomicetoma por *N. brasiliensis* y la respuesta inmune sistémica.
- 2) Cuantificar la expresión de PD-1 en linfocitos T y PD-L1 en neutrófilos y macrófagos en el actinomicetoma por *N. brasiliensis*.
- 3) Evaluar el efecto del bloqueo de PD-L1 en la progresión del actinomicetoma por *N. brasiliensis*.

6 ESTRATEGIA GENERAL

6.1 Diseño experimental

Para evaluar el efecto del bloqueo de PD-L1 en la progresión del actinomicetoma por *N. brasiliensis*, se estableció en una primera etapa el modelo experimental de micetoma en ratones BALB/c mediante la inoculación de *N. brasiliensis* en el cojinete plantar. Una vez desarrollada la infección crónica (70 y 100 días post infección), se caracterizó la inmunopatología local y la respuesta inmune sistémica, incluyendo la cuantificación de la carga bacteriana, el perfil de citocinas séricas, la histopatología de la lesión y la morfometría de los granos bacterianos.

En una segunda etapa, se determinó por citometría de flujo la expresión de PD-1 en linfocitos T y de PD-L1 en neutrófilos y macrófagos en el tejido infectado. Finalmente, se evaluó el efecto del bloqueo de PD-L1 administrando atezolizumab (anticuerpo monoclonal humanizado anti-PD-L1) a dosis de 10 mg/kg por vía intraperitoneal, en esquemas de una o cuatro dosis semanales a partir de la semana 10 post-infección.

6.2 Aprobación por el comité de ética

Los ratones fueron manipulados de acuerdo con la normativa regional (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999). Todos los experimentos se realizaron conforme a los lineamientos institucionales y fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) y por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de la UANL, el cual está registrado ante la Comisión Nacional de Bioética, Secretaría de

Salud, bajo el número de registro CONBIOÉTICA-19-CEI-001-20160404. Este protocolo está registrado en nuestra Institución con el número IN22-00004.

6.3 Tamaño de la muestra

Para determinar el tamaño de la muestra, se empleó el contraste de hipótesis de diferencias entre dos medias de muestras independientes. La variable cuantitativa continua considerada para este diseño fue el porcentaje (%) de expresión de la molécula de coinhibición PD-L1 en neutrófilos periféricos, tomando como parámetro de dispersión una desviación estándar (σ) común de 2.2 %, unidades expresadas con dispersión: 9.583 ± 2.2 %, dato derivado de estudios previos en modelos de infección aguda a las 72 horas ⁹¹.

El cálculo se fundamentó en la fórmula matemática estándar para la comparación de dos medias independientes con varianzas homogéneas:

$$n = \frac{2 \cdot (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \cdot \sigma^2}{\delta^2}$$

Donde se sustituyeron los siguientes valores y criterios de poder:

n : Número de sujetos requeridos por grupo.

$Z_{\alpha/2}$: Valor de la distribución normal estándar para un error tipo I (alfa) bilateral.

Para un riesgo alfa de 0.05 (nivel de confianza del 95 %), $Z_{\alpha/2} = 1.96$.

Z_{β} : Valor de la distribución normal estándar para un error tipo II (beta). Para un riesgo beta de 0.20 (poder del estudio del 80 %), $Z_{\beta} = 0.84$.

σ : Desviación estándar común del parámetro en la población (2.2 %).

δ : Diferencia mínima que se desea detectar entre los grupos, fijada en un 3.5 % de expresión (3.5 unidades).

$$n = \frac{2 \cdot (1.96 + 0.84)^2 \cdot 2.2^2}{3.5^2} = \mathbf{6.19 \textit{ ratones por grupo}}$$

Se determinó un tamaño muestral base de 6 ratones por grupo experimental. Este número final de sujetos absorbe de manera eficiente la variabilidad biológica intrínseca del modelo crónico de actinomicetoma. Asimismo, asumiendo la tasa histórica de pérdidas de seguimiento por falta de desarrollo del micetoma experimental o mortalidad preanalítica de aproximadamente el 10%, fenómeno metodológico previamente reportado para este modelo ²⁷; este tamaño de muestra asegura mantener un mínimo crítico de 5 sujetos evaluables por grupo al concluir el periodo de evaluación crónica.

6.4 Manejo de animales de laboratorio

En este estudio se utilizaron ratones hembra BALB/c (de 8 a 10 semanas de edad; 20 $\pm$ 2 g), mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos en el bioterio del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González y de la Facultad de Medicina de la UANL.

Los animales se alojaron en cajas de material acrílico con encamado de aserrín previamente esterilizado en autoclave (121 °C / 15 lbs). El bioterio operó con temperatura controlada (20-25 °C), humedad relativa (60% $\pm$ 5%) y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, siguiendo los protocolos estándar establecidos en nuestro

laboratorio. Los animales tuvieron acceso sin restricciones a agua estéril y alimento comercial para roedores.

Los ratones infectados y sanos se alojaron en habitaciones separadas para evitar la contaminación cruzada.

6.5 Supervisión del bienestar animal y punto final humanitario

El bienestar animal y el estado clínico se evaluaron diariamente por personal veterinario utilizando los sistemas de Puntaje de Sepsis Murina (MSS) ⁹⁵ y Puntaje de Condición Corporal (BCS) ⁹⁶, incluyendo la observación de cambios en el peso, el comportamiento y la presencia de estereotipias (como excesivo acicalamiento, movimientos repetitivos o letargo).

Los animales fueron observados cada 24 horas después del inicio del protocolo de infección. Una vez iniciada la administración de anti-PD-L1, los animales fueron revisados cada 12 horas.

En este protocolo se establecieron criterios de eutanasia como un puntaje de condición corporal inferior a 2, un MSS acumulativo que indicara estado moribundo, o una pérdida de peso corporal superior al 10 % con respecto al valor basal. Dado que estos animales no alcanzaron ninguno de estos umbrales clínicos o de pérdida de peso antes del punto final, no se realizó eutanasia anticipada.

7 METODOLOGÍA

7.1 Modelo de infección

7.1.1 Cepa bacteriana

Se utilizó la cepa de referencia de *N. brasiliensis* ATCC 700358 caracterizada por el grupo de trabajo ²⁷. Esta cepa se cultivó en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 30 ml de caldo infusión cerebro corazón o BHI (del inglés, *Brain Heart Infusion*) estéril fueron incubadas por 6 días a 37°C en constante agitación.

7.1.2 Obtención de la suspensión unicelular de *N. brasiliensis*

La masa bacteriana recuperada de los matraces se colocó en tubos cónicos de 50 ml, previamente pesados en balanza analítica, y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min (min). Posterior a la centrifugación, se decantó el sobrenadante y la masa bacteriana depositada en el sedimento se lavó con 30 ml de solución salina estéril normal (SSN), repitiendo el proceso de centrifugación y lavado dos veces más. Después de realizar los lavados, las bacterias se disgregaron y se homogeneizaron en un Potter-Elvehjem para obtener una suspensión unicelular.

7.1.3 Preparación del inóculo de *N. brasiliensis* para la infección

La suspensión bacteriana se sometió a dos ciclos más de lavado con SSN y centrifugación como se mencionó. Se descartó por completo el sobrenadante y se pesó el tubo con la masa bacteriana para obtener el peso húmedo total de la masa recuperada. Se agregó SSN suficiente para ajustar el inóculo a 40 mg de *N. brasiliensis* en 50 µl de SSN por cada ratón a infectar.

7.1.4 Inducción experimental del actinomicetoma

A cada ratón se le inocularon, de forma subcutánea, 50 µl de la suspensión de *N. brasiliensis* en el cojinete plantar de la pata izquierda trasera con jeringa de 1 ml y aguja calibre 16 G x 16 mm.

7.1.5 Seguimiento de la evolución del actinomicetoma

Se tomó un registro diario del volumen de la lesión en el cojinete plantar (ancho (2a) × largo (2b) × alto (2c)) con un vernier digital (Figura 6. Medición tridimensional del actinomicetoma en el modelo murino) y se calculó el volumen utilizando la ecuación del volumen del elipsoide:

$$V = \frac{4}{3}\pi abc$$

Se calculó el porcentaje de cambio de volumen para evaluar la evolución de la lesión a través del tiempo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cambio de volumen} = \frac{\text{volumen final} - \text{volumen inicial}}{\text{volumen inicial}} \times 100$$

El volumen inicial es el resultado de las medidas del cojinete plantar antes de la infección y el volumen final es el resultado de las medidas tomadas el día post infección determinado. El cambio de peso de los animales también fue evaluado a través de la fórmula anterior.

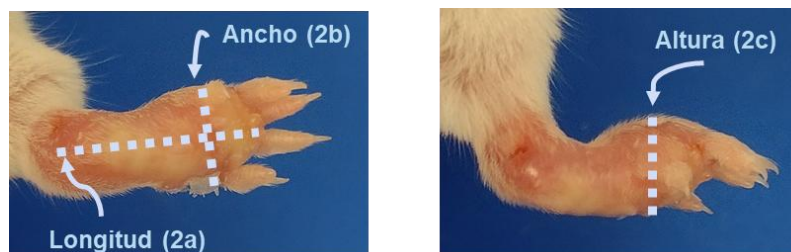


Figura 6. Medición tridimensional del actinomicetoma en el modelo murino

Representación esquemática de los planos anatómicos evaluados *in vivo* utilizando un vernier digital para determinar el desarrollo de la lesión en el miembro posterior del ratón BALB/c. El registro diario del crecimiento macroscópico incluyó la medición de: (2a) longitud (eje longitudinal de la extremidad), (2b) ancho (eje transversal del cojinete plantar) y (2c) altura (espesor dorso-plantar en la zona de mayor tumefacción). Los valores obtenidos a partir de estos tres ejes fueron integrados matemáticamente mediante la fórmula del volumen de un elipsoide para el cálculo del volumen total de la lesión.

7.2 Esquema de administración del anticuerpo anti-PD-L1

7.2.1 Administración del anticuerpo monoclonal.

Los ratones infectados que desarrollaron actinomicetoma, seleccionados al azar, fueron tratados con atezolizumab a una dosis total de 10 mg/kg en 200 μ l de SSN como vehículo, por vía intraperitoneal, el día 70 postinfección (dpi). Se administraron dosis semanales sucesivas hasta completar una o cuatro dosis, según el grupo experimental asignado. Se incluyó un grupo de ratones sanos que recibieron cuatro dosis del anticuerpo y un grupo de ratones sanos que recibieron solo el vehículo. Se realizaron los análisis de las muestras biológicas en la semana posterior a la última administración del anticuerpo.

7.3 Obtención de muestras biológicas

7.3.1 Eutanasia.

Posterior a la anestesia profunda (mezcla de ketamina 2 mg/xilacina 0.4mg) y a la eutanasia por dislocación cervical, se recolectó sangre mediante punción cardíaca.

Antes del procedimiento quirúrgico, la piel del animal se sometió a antisepsia con alcohol etílico al 70 %, seguida de una solución de povidona yodada. El bazo, el ganglio linfático poplíteo ipsilateral y el micetoma completo se diseccionaron para su uso en los procedimientos experimentales posteriores. Todos estos procedimientos se realizaron en condiciones estériles.

7.3.2 Obtención de sangre total.

La sangre se obtuvo por punción cardíaca, previa anestesia, aproximadamente 0.8 a 1 ml de sangre total sin anticoagulante. Se dejó reposar la sangre 30 min para permitir la formación del coágulo, posteriormente se centrifugó a 1000 xg por 10 min para obtener la fracción sérica. El suero se almacenó en ultracongelación, a -80C°, hasta su análisis.

7.3.3 Obtención de la suspensión celular a partir de tejido

El bazo y el ganglio linfático poplíteo se extirparon quirúrgicamente, se pesaron en una balanza digital y se colocaron en medio RPMI completo (cRPMI). El tejido se disgregó suavemente de manera mecánica utilizando pinzas con dientes y se presionó suavemente a través de un filtro celular de 70 µm.

Los eritrocitos se eliminaron con solución de lisis 1X, en agitación durante 10 min, se lavaron y se resuspendieron en cRPMI. El número total de células por tejido se determinó manualmente en cámara de Neubauer.

El tejido del micetoma se disgregó mecánicamente, se incubó con 5 ml de cRPMI que contenía una mezcla 1X de collagenasa y hialuronidasa durante 30 min a 37 °C para la digestión enzimática. Posteriormente, la muestra se lavó con cRPMI, las células se

filtraron, se resuspendieron y se contaron siguiendo el protocolo anterior en condiciones de esterilidad.

7.3.4 Descalcificación del tejido a incluir en parafina

Para el análisis histopatológico del actinomicetoma, se llevó a cabo un proceso de descalcificación química del tejido a analizar. Los fragmentos del actinomicetoma se sumergieron en la solución descalcificadora y se incubaron a 4 °C.

Con la finalidad de asegurar una quelación eficiente y continua de los iones de calcio, sin comprometer la antigenicidad ni la integridad estructural del grano actinomicótico, se realizaron recambios diarios de la solución descalcificadora durante un periodo continuo de 14 días previos a su inclusión en parafina.

7.4 Análisis *ex vivo* de muestras obtenidas del modelo *in vivo*

7.4.1 Evaluación de la carga bacteriana de *N. brasiliensis*

La carga bacteriana en los cojinetes plantares de los ratones se cuantificó realizando diluciones seriadas de la suspensión celular en SSN (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000), las cuales se sembraron por triplicado en agar BHI; esto se llevó en condiciones de esterilidad.

Después de un período de incubación de una semana a 37 °C, se contaron manualmente las colonias de *N. brasiliensis*, lo que permitió calcular las UFC por gramo (g) de tejido.

7.4.2 Inmunofenotipo de células T y mieloides por citometría de flujo

A partir de las suspensiones celulares obtenidas de los tres tejidos, se tomaron 10⁶ células/ml provenientes de ratones individuales, se incubaron con anticuerpos monoclonales conjugados para citometría de flujo.

Estas células se tiñeron para marcadores de superficie celular con el fin de identificar poblaciones linfocitarias mediante el reconocimiento de CD3, CD4, CD8a y CD279 (PD-1). Para las poblaciones mieloides, en un tubo separado, se utilizaron los marcadores de superficie para CD45, Ly6G, F4/80 y CD274 (PD-L1), y se incubaron durante 30 min a 4 °C en oscuridad, se lavaron y se resuspendieron en 500 µl de cRPMI. Se adquirió un total de 100000 eventos por muestra utilizando un citómetro LSR Fortessa, y la estrategia de selección se generó manualmente utilizando controles de fluorescencia menos uno o FMO (Fluorescence Minus One) para la identificación de poblaciones de leucocitos, así como control de viabilidad con la tinción con 7-aminoactinomicina D (7-AAD) con el software FACSDiva (Figura 7. Estrategias de selección por citometría de flujo (*gating*) para la identificación de poblaciones celulares linfoides y mieloides, Figura 8. Evaluación de la expresión de PD-1 y PD-L1 en subpoblaciones leucocitarias mediante citometría de flujo, Figura 9. Evaluación de la expresión en MFI de PD-1 y PD-L1 y número de células positivas al eje de punto de control en subpoblaciones leucocitarias mediante citometría de flujo).

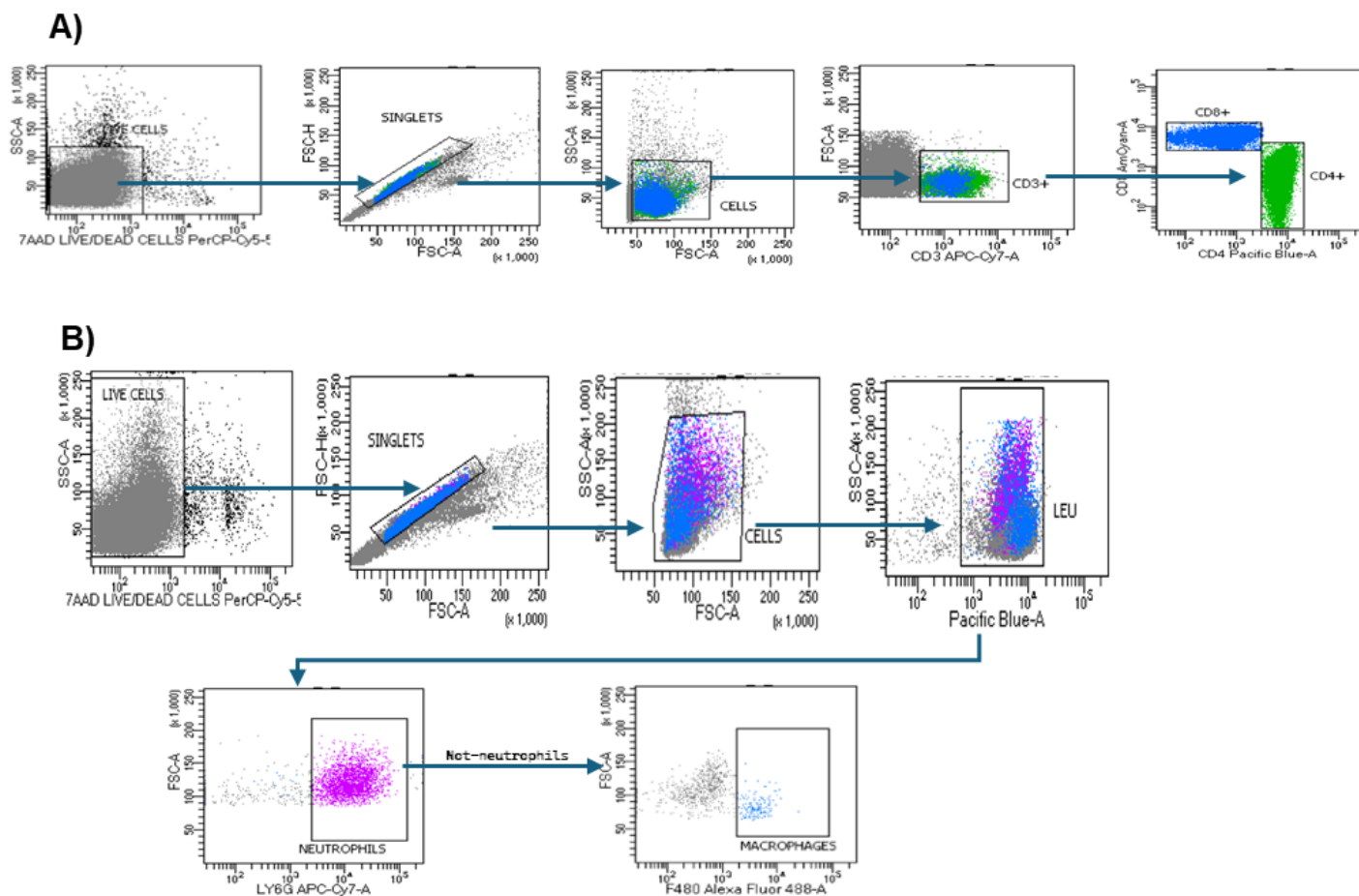


Figura 7. Estrategias de selección por citometría de flujo (*gating*) para la identificación de poblaciones celulares linfoides y mieloides

Representación secuencial del análisis jerárquico de subpoblaciones leucocitarias obtenidas a partir de suspensiones celulares murinas obtenidos con FACSDiva. A) panel linfóide. B) Panel mioide.

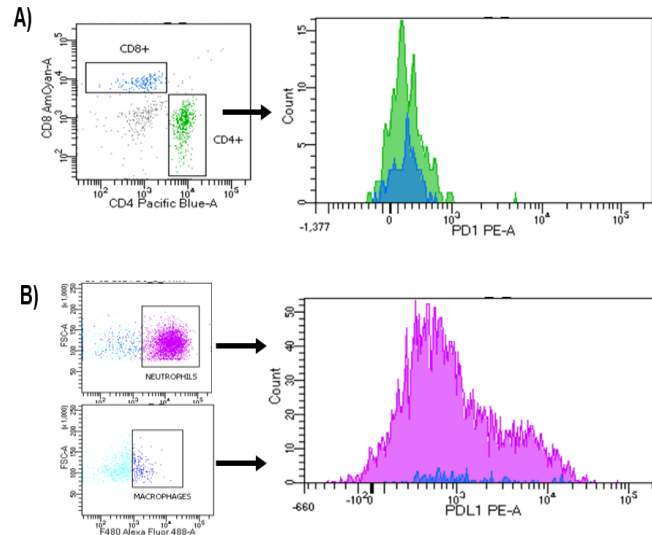


Figura 8. Evaluación de la expresión de PD-1 y PD-L1 en subpoblaciones leucocitarias mediante citometría de flujo

Histogramas representativos que muestran los niveles de expresión (MFI) de los puntos de control inmunitario en esplenocitos murinos obtenidos con FACSDiva. A) Panel linfóide para la evaluación de PD-1. B) Panel mieloide: para la evaluación del ligando PD-L1. Las flechas indican la secuencia del análisis jerárquico a partir de la población (*bulk*).

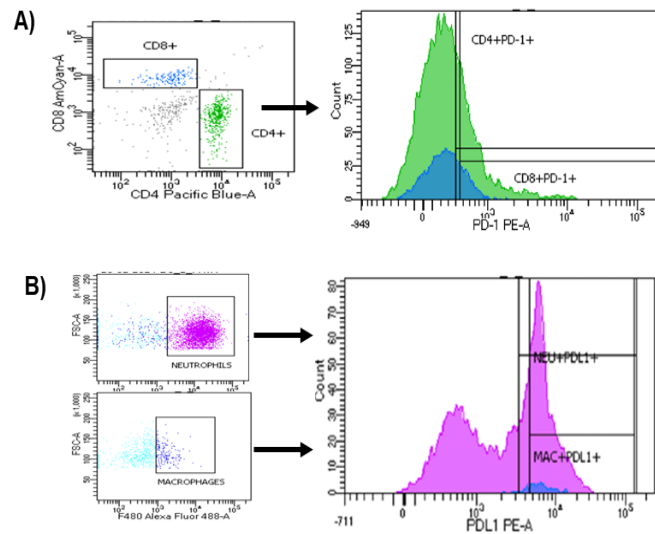


Figura 9. Evaluación de la expresión en MFI de PD-1 y PD-L1 y número de células positivas al eje de punto de control en subpoblaciones leucocitarias mediante citometría de flujo

Histogramas representativos de los puntos de corte establecidos mediante los controles FMO (*Fluorescence minus one*) obtenidos con FACSDiva. A) Panel Linfóide para la evaluación de PD-1. B) Panel Mieloide: para la evaluación del ligando PD-L1. Las flechas indican la secuencia del análisis jerárquico a partir de la población.

7.4.2.1 Estrategia de *gating* para linfocitos T

Los linfocitos se seleccionaron en una ventana utilizando la altura versus el área de la dispersión frontal (FSC-H y FSC-A, respectivamente) para seleccionar eventos únicos o *singlets*, seguido de una ventana de FSC-A versus el área de dispersión lateral (SSC-A) para seleccionar los eventos correspondientes a células y descartar detritos celulares.

Las células CD3⁺ (linfocitos T) se identificaron en la población de células mononucleares, y los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ cooperadores y de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos se calcularon en relación con el total de células CD3⁺. A partir de las poblaciones de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, se desplegó un *gate* para cuantificar el número de células positivas para PD-1, así como un histograma para visualizar la intensidad media de fluorescencia o MFI (*Median Fluorescence Intensity*), empleando el control FMO para definir las poblaciones positivas a los marcadores mencionados.

7.4.2.2 Estrategia de *gating* para células mieloides

Para el análisis mieloide, los leucocitos CD45⁺ se seleccionaron a partir de los *singlets* y luego se analizaron mediante FSC-A vs SSC-A. Los neutrófilos se identificaron como células Ly6G⁺, mientras que los macrófagos se definieron como células F4/80⁺; estos se seleccionaron a partir de las CD45⁺ en *gates* individuales.

Los porcentajes se expresaron en relación con el total de leucocitos CD45⁺. Se utilizaron controles de fluorescencia menos uno (FMO) para definir las poblaciones positivas a los marcadores mencionados. A partir de las poblaciones celulares

mencionadas, se desplegó un *gate* para cuantificar el número de células positivas para PD-L1, así como un histograma para visualizar la MFI.

7.4.3 Análisis multiplex de citocinas séricas por citometría de flujo

El ensayo se realizó con suero obtenido de sangre extraída mediante punción cardíaca en intervalos de tiempo específicos. Se siguió estrictamente la metodología descrita en el kit de citometría de perlas en suspensión o CBA (*Cytometric Bead Array*) *Mouse Inflammation Kit*.

La cuantificación de citocinas se realizó con el citómetro BD LSR Fortessa y el software FACSDiva para la adquisición de eventos. El análisis de datos se ejecutó utilizando el software *CBA Analysis Software* para determinar la concentración de cada citocina: IL-6, IL-10 e IL-12p70, el ligando de quimiocina con motivo C-C 2 (CCL2), también conocido como MCP-1, IFN- γ y TNF, en pg/ml, con referencia en la curva derivada de estándares comerciales que abarcan concentraciones de 20 a 5000 pg/ml. Se capturaron un total de 6000 eventos.

7.4.4 Histopatología del tejido infectado

7.4.4.1 Obtención de la biopsia, tinción y montaje.

Una biopsia de tejido del cojinete plantar infectado, con dimensiones mínimas de 0.5 cm $\times$ 0.5 cm, se deshidrató y se embebió en parafina según procedimientos estándar. Los bloques de tejido se cortaron en secciones de 4 μ m de grosor y se montaron en portaobjetos para la tinción con hematoxilina y eosina (H&E); adicionalmente se montaron cortes en laminillas silanizadas con carga positiva para análisis posteriores.

7.4.4.2 Tinción con H&E

Las secciones de tejido de 4 µm de grosor montadas previamente se desparafinaron en dos baños sucesivos de xileno durante 10 min cada uno.

Posteriormente, las muestras se rehidrataron en una serie decreciente de concentraciones de etanol (absoluto, al 95% y al 70%) por un periodo de 3 min en cada paso, finalizando con un enjuague en agua destilada durante 3 min.

La tinción nuclear se llevó a cabo por inmersión en hematoxilina de Harris durante un tiempo óptimo de 3 a 5 min; tras un lavado con agua destilada para retirar el exceso de colorante, el viraje de los núcleos se realizó en agua corriente durante 1 minuto.

Posteriormente, la tinción citoplasmática se ejecutó mediante la incubación de los cortes en eosina alcohólica de 1 a 3 min. Concluido este paso, el tejido se sometió a una deshidratación rápida a través de un cambio en etanol al 95% por 1 minuto y dos cambios en etanol absoluto por 2 min cada uno.

Finalmente, las preparaciones se diafanizaron en dos baños de xileno de 5 min cada uno y se fijaron con resina sintética mediante el empleo de cubreobjetos largos para su posterior análisis microscópico.

7.4.4.3 Evaluación por patología

Dos médicos especialistas en patología, cegados a los grupos experimentales, evaluaron las lesiones en ocho campos y asignaron un sistema de puntuación semicuantitativo basado en los siguientes criterios: ausencia del hallazgo (nulo), presencia escasa (+ = 1), presencia moderada (++ = 2) y presencia abundante (+++ = 3).

Los hallazgos evaluados comprendieron la infiltración celular, incluyendo PMN, linfocitos, células plasmáticas, fibroblastos y células espumosas; además se evaluaron datos patológicos del tejido como edema, congestión vascular, necrosis, paniculitis e inflamación perineural; y signos directos de infección, incluyendo la presencia de microabscesos y granos bacterianos. Esta evaluación se realizó en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina, UANL.

7.4.4.4 Morfometría de los granos bacterianos

Las secciones de biopsia de tejido (actinomicetoma) se tiñeron con H&E y posteriormente se examinaron utilizando un microscopio digital equipado con una cámara. Las imágenes se obtuvieron con aumentos de 10X y 40X, empleando el software Motic Images Plus 3. Los granos bacterianos se identificaron de acuerdo con sus características morfológicas distintivas.

Para el análisis morfométrico, se seleccionaron y contaron manualmente todos los granos visibles dentro de la sección de tejido, y se cuantificó su área (μm^2) y perímetro (μm) utilizando las herramientas de medición integradas del software, siguiendo los procedimientos de calibración del proveedor.

El índice de circularidad fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de circularidad} = \frac{4\pi \times \text{área}}{\text{perímetro}^2}$$

Los granos que se intersecaban con los bordes de la imagen fueron excluidos para evitar mediciones parciales.

7.5 Ensayos funcionales *in vitro*

7.5.1 Ensayo de proliferación con CFSE en esplenocitos de ratón BALB/c

7.5.1.1 Aislamiento celular

Los bazo de ratones BALB/c, con actinomicetoma de 100 dpi y controles sanos, se obtuvieron en condiciones estériles y se colocaron en 5 ml de cRPMI frío. El tejido se disgregó mecánicamente en un tamiz de 70 μm y se agregaron en 10 ml de cRPMI.

La suspensión celular se centrifugó a 1800 rpm durante 5 min a 4 °C y los eritrocitos se lisaron mediante incubación con 1 ml de amortiguador de lisis amonio-cloruro-potasio (ACK) durante 5 min a 4°C. La reacción se neutralizó con 10 ml de cRPMI y se centrifugó de nuevo. Las células se lavaron con amortiguador de fosfatos (PBS) y se filtraron cuando fue necesario. La viabilidad mínima, evaluada con la técnica de exclusión con azul de tripano, para continuar con el experimento fue del 90%. La concentración celular se ajustó a $1-5 \times 10^7$ células/ml en PBS.

Las células mononucleares se separaron mediante un gradiente de densidad. Se colocaron 3 ml de Ficoll-Paque en tubos cónicos de 15 ml, y sobre este se añadieron cuidadosamente 6 ml de la suspensión celular sin mezclar las fases. Las células se centrifugaron a 1800 rpm durante 30 min sin freno, a 4°C.

La interfase blanquecina que contenía los mononucleares se recolectó con una pipeta Pasteur y se transfirió a un tubo nuevo, al que se añadieron 10 ml de cRPMI o de PBS. Se centrifugó a 1800 rpm durante 8-10 min y se repitió un segundo lavado. Finalmente, las células se resuspendieron en cRPMI.

7.5.1.2 Tinción con carboxifluoresceína (CFSE)

Para el marcaje de células mononucleares con CFSE, se ajustaron a 1×10^7 células/ml en PBS precalentado a 37 °C en incubadora. El CFSE se añadió a concentraciones finales de 5 μ M y se incubó durante 10 min a 37 °C la incubadora, siempre protegido de la luz, e invirtiendo suavemente cada 3-4 min. La reacción se detuvo añadiendo 5 volúmenes de cRPMI frío y se incubó 5 min en hielo. Las células se centrifugaron y lavaron dos veces con cRPMI, y finalmente se ajustaron a una densidad de 2.5×10^6 células/ml para la siembra.

7.5.1.3 Cultivo celular de esplenocitos de ratón BALB/c y estimulación celular con mitógeno

Las células se sembraron en una placa de 96 pozos con fondo en U, con un volumen de 100 μ L de la suspensión (2.5×10^5 células por pozo). Posteriormente, se añadieron 100 μ L de medio cRPMI, así como el estimulante concanavalina A (ConA) a concentración de 5 μ g/ml, con o sin atezolizumab a una concentración de 10 μ g/ml, alcanzando el volumen final de 200 μ l por pozo. Las células se incubaron durante 72 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. Se incluyeron controles de células en medio solo (sin estímulo) y de estímulo inicial a las 24 horas. Todas las condiciones se realizaron por triplicado.

Al finalizar el experimento, se recolectaron las células de tres pozos que cumplían con las mismas variables, se colocaron en tubos para citometría, y se añadió 1 ml de PBS. Los tubos se centrifugaron a 1800 rpm para realizar un paso de lavado; al finalizar, se decantaron los tubos y las células se resuspendieron en 500 μ l para su lectura por citometría de flujo.

7.5.1.4 Adquisición de eventos y análisis de datos

Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo, con un mínimo de 500000 eventos en total. El análisis de datos se realizó en el software FACSDiva así como por ModFit LT, mediante una estrategia de selección que excluyó dobletes, y seleccionó las células individuales (FSC-H vs FSC-A), seguida de la selección de la población linfocitaria (FSC-A vs SSC-A). Se incluyeron los siguientes controles: células sin teñir, control 7-AAD y control FMO para CFSE (Figura 10. Estrategia de análisis de proliferación por CFSE).

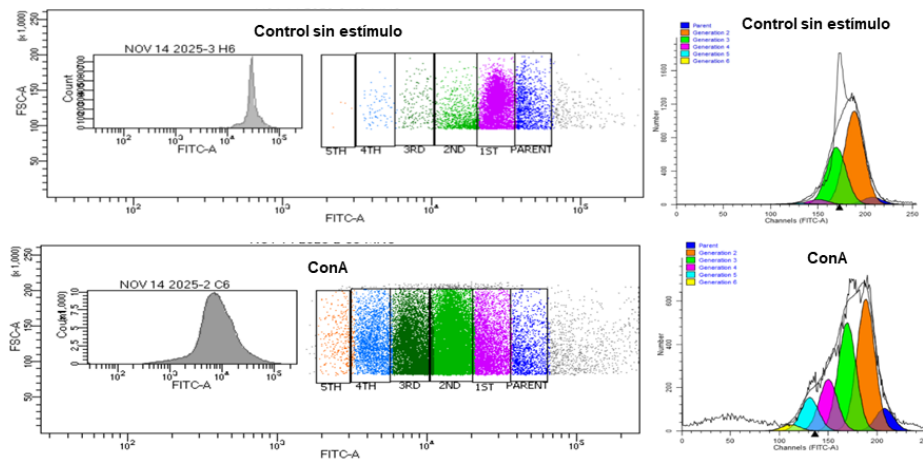


Figura 10. Estrategia de análisis de proliferación por CFSE

Izquierda: Histogramas de fluorescencia de CFSE en células no estimuladas (control) vs estimuladas con ConA obtenidos de FACSDiva. Derecha: Análisis de generaciones mediante ModFit LT.

En la población objetivo, se analizó la dilución de CFSE para determinar el porcentaje de células que se dividieron, el índice de proliferación y el número de divisiones. Se calculó el índice de estimulación con la siguiente fórmula ²⁷:

$$\text{Índice de estimulación} = \frac{\text{Índice de proliferación ConA}}{\text{Índice de proliferación basal}}$$

7.5.2 Ensayo de adhesión de neutrófilos en cámara de Boyden modificada

7.5.2.1 Aislamiento celular

Los bazo de ratones BALB/c, con actinomicetoma de 100 dpi y controles sanos, se obtuvieron en condiciones estériles. Se preparó una suspensión celular según lo ya descrito en el protocolo anterior, sin realizar la separación por gradiente de densidad. Se ajustó la suspensión a una concentración de 1×10^6 células/ml en medio cRPMI.

7.5.2.2 Bloqueo de PD-L1

La suspensión celular se incubó con atezolizumab 50 µg/ml, por 1 hora a 37 °C, en una atmósfera de 5% CO₂. Adicionalmente, se agregó un grupo control que fue incubado con PBS. Al término, se realizó un lavado y las células se resuspendieron en cRPMI.

7.5.2.3 Preparación del quimioatrayente

Como fuente de quimioatrayente se utilizó una suspensión de *N. brasiliensis*. Se preparó a partir de un cultivo de 6 días, el cual fue inactivado por calor, a 65°C por 45 min. Después, este cultivo se ajustó al estándar 1 de McFarland.

Se tomaron 500 µl de la suspensión, y se agregaron con 500 µl de amortiguador Veronal y 700 µl de solución de Geys, obteniendo un volumen final de 1.7 ml por condición en tubos cónicos de 15 ml. Se utilizó PBS para sustituir la suspensión celular en el caso del control negativo.

7.5.2.4 Configuración de la cámara de Boyden

En la cámara de Boyden limpia y seca, se colocó el filtro de nitrocelulosa con un poro de 0.45 µm, y se fijó con la rosca del compartimento superior. La cámara inferior se llenó con la mezcla quimioatrayente mediante una jeringa de 3 ml, inclinándola

ligeramente para evitar la formación de burbujas, dejando un volumen remanente de 0.5 ml por dispensar.

Posteriormente, se depositaron simultáneamente 0.5 ml de la suspensión celular (5×10^5 células/ml) en la cámara superior mientras se completaba el llenado de la cámara inferior con los últimos 0.5 ml de la mezcla quimioatrayente (Figura 11. Representación esquemática de la configuración de la cámara de Boyden modificada para el ensayo de adhesión). Las cámaras se cubrieron con cubreobjetos largos para evitar la evaporación y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante una hora.

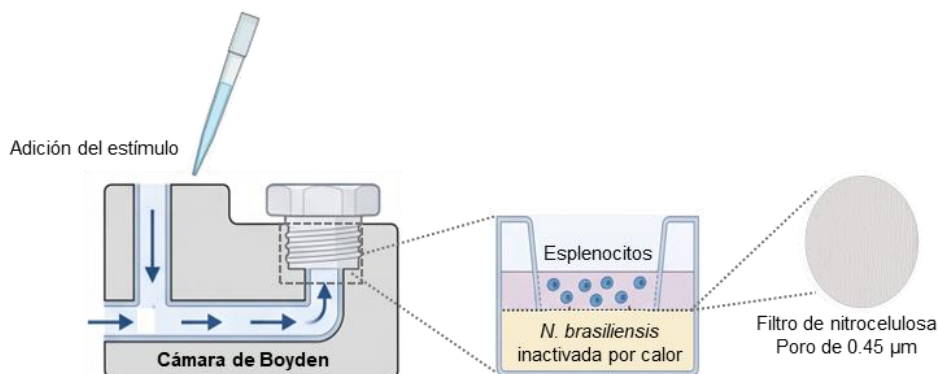


Figura 11. Representación esquemática de la configuración de la cámara de Boyden modificada para el ensayo de adhesión

Esquema metodológico que ilustra el ensamble y el gradiente químico establecidos para evaluar la migración celular *in vitro*. A la izquierda se detalla la estructura del dispositivo, destacando el canal de adición del estímulo quimioatrayente hacia el compartimento inferior. El recuadro central muestra la sección transversal ampliada del sistema de pozos, donde el compartimento superior contiene la suspensión de esplenocitos en medio de cultivo, separado de la cámara inferior (que contiene la suspensión de *N. brasiliensis* inactivada por calor como quimioatrayente directo) mediante un filtro intermedio de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45 µm (detalle a la derecha). Las flechas indican el flujo y la dirección del gradiente quimiotáctico. La representación gráfica de la cámara de Boyden fue elaborada con Gemini <https://gemini.google.com/>.

7.5.2.5 Tinción del filtro

Transcurrido el tiempo de incubación, se desmontaron las cámaras, se retiró el sobrenadante con pipeta y los filtros se tiñeron con H&E. Los filtros se montaron en portaobjetos con resina, orientando el filtro con el lado que contenía las células hacia el observador, y encima se colocó un cubreobjetos para sellarlo.

7.5.2.6 Conteo celular

Se contó manualmente el total de células adheridas en 10 campos por filtro, y se obtuvo el promedio. Se examinaron utilizando un microscopio digital equipado con una cámara. Las imágenes se obtuvieron con aumentos de 10X, empleando el software Motic Images Plus 3.

7.6 Análisis estadístico

La distribución de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Los valores atípicos (*outliers*) se identificaron y excluyeron utilizando el método ROUT ($Q = 1\%$).

Las estadísticas descriptivas se presentan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM) para datos paramétricos, o como mediana y rango intercuartil (IQR) para datos no paramétricos, utilizando la misma escala para cada variable biológica.

Para la estadística inferencial, las comparaciones entre dos grupos se realizaron mediante la prueba *t* de Student para muestras independientes. Para comparaciones de múltiples grupos, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey para datos paramétricos, mientras que para datos no paramétricos se empleó la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

La significancia estadística se definió como $p < 0.05$. Los valores estadísticamente significativos se representan como: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ y $****p < 0.0001$. El análisis se realizó utilizando GraphPad Prism.

8 RESULTADOS

8.1 Evaluación clínica del modelo de actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*

La progresión de la lesión a lo largo del tiempo se caracterizó por una trayectoria consistente con la historia natural de los patrones de lesión por micetoma (Figura 12. Cinética de la lesión en el modelo experimental de actinomicetoma). La evolución clínica del micetoma reveló fases distintas.

Durante la fase aguda, se observó hiperemia localizada, eritema, edema y la formación de un nódulo cutáneo en el sitio de inoculación, que culminaron en un volumen máximo de la lesión a los 5 dpi ($0.3433 \text{ cm}^3 \pm 0.0202 \text{ cm}^3$, $402.80\% \pm 27.89\%$ de cambio de volumen con respecto a los niveles basales). A los 25 dpi, los signos de inflamación disminuyeron (volumen de la lesión: $0.1236 \text{ cm}^3 \pm 0.0057 \text{ cm}^3$, $73.63\% \pm 9.36\%$), aunque persistió una induración residual.

Se observó un resurgimiento de la inflamación entre los 30 y 45 dpi, caracterizado por edema intermitente, exudación serosa y formación temprana de trayectos fistulosos.

La fase crónica (70 a 100 dpi) se definió por una estabilidad clínica: el volumen de la lesión se estabilizó a los 70 dpi (volumen de la lesión: $0.3954 \text{ cm}^3 \pm 0.0241 \text{ cm}^3$, $349.40\% \pm 64.55\%$), con fluctuaciones transitorias y no significativas a los 100 dpi (volumen de la lesión: $0.4253 \text{ cm}^3 \pm 0.0482 \text{ cm}^3$, $523.90\% \pm 74.78\%$). En esta fase crónica se observaron abscesos supurativos, trayectos fistulosos, senos dérmicos que drenaban material seropurulento, gránulos blancos macroscópicos y la deformación característica de la extremidad.

En la Figura 12. Cinética de la lesión en el modelo experimental de actinomicetoma, se muestra un resumen gráfico de estos cambios en el tamaño de la lesión en comparación con el volumen de base antes de la infección.

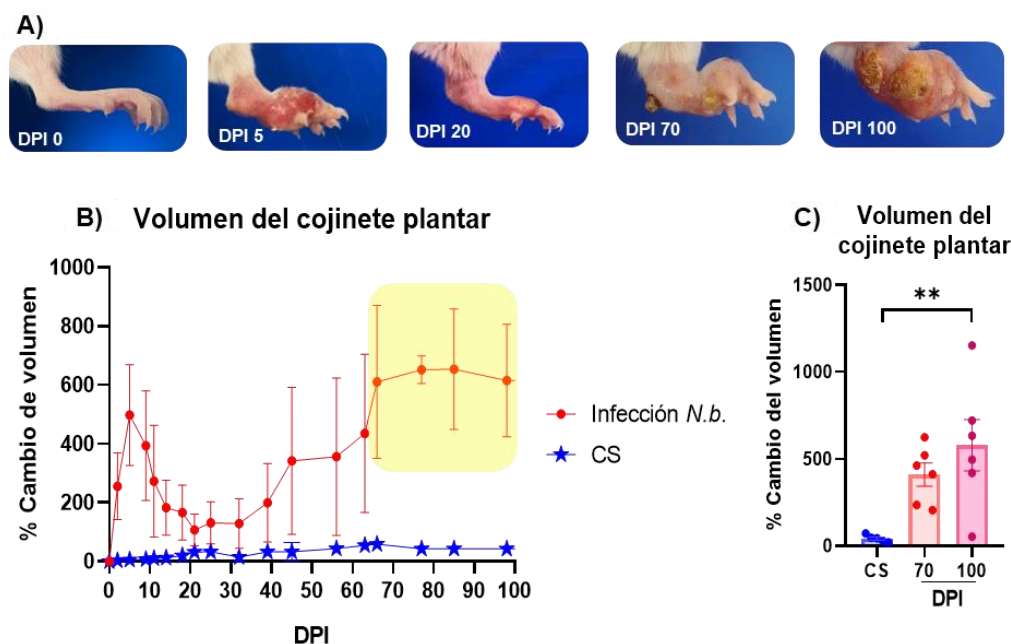


Figura 12. Cinética de la lesión en el modelo experimental de actinomicetoma

A) Fotografías representativas de la evolución clínica de la lesión, mostrando el control sin infección (0 dpi), la fase aguda (5 dpi, n=12), de resolución parcial (20 dpi, n=12) y crónica (70 y 100 dpi, n=12). B) Representación esquemática de la progresión de la lesión a lo largo del tiempo. C) Cuantificación del cambio porcentual en el volumen del cojinete plantar en relación con el valor basal preinfección (n=6). Los datos fueron agrupados a partir de dos experimentos independientes. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey. DPI= días post infección; CS= control sano; *N.b.*=*Nocardia brasiliensis*.

Todos los animales se mantuvieron dentro del rango permitido para continuar con el experimento (Figura 13. Peso corporal de los animales infectados). A los 70 dpi, los animales infectados mostraron una disminución significativa en el peso corporal en comparación con los controles sanos, aunque el cambio porcentual fue de $3.58\% \pm 3.059\%$. A los 100 dpi, el cambio porcentual fue de $12.24\% \pm 3.687\%$.

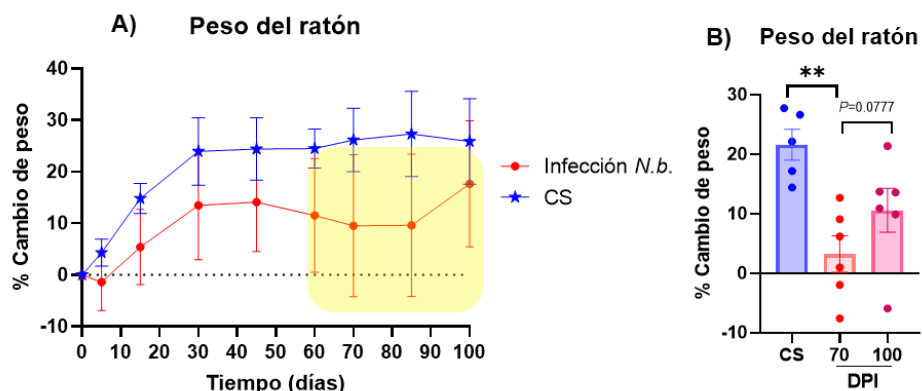


Figura 13. Peso corporal de los animales infectados

A) Ningún animal presentó pérdida de peso suficiente para excluirlo del experimento. B) Se observó una disminución en el grupo infectado a 70 dpi en comparación con los controles sanos (n=6 por grupo). Los datos fueron agrupados a partir de dos experimentos independientes. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. Las comparaciones estadísticas se realizaron con ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey. DPI= días postinfección; CS= control sano.

Los tejidos obtenidos y procesados se pesaron para análisis posteriores, incluidos el cojinete plantar (sitio de la lesión), el ganglio linfático poplíteo (drenante de la extremidad infectada) y el bazo (órgano linfoide sistémico).

El peso del cojinete plantar (Figura 14. Peso de los tejidos obtenidos del modelo experimental de actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*) mostró un aumento progresivo y significativo en los animales infectados en comparación con los no infectados. El tejido sano presentó un peso de 0.1985 g (rango intercuartil, IQR: 0.1990 – 0.2000). A los 70 dpi el peso aumentó a 0.8167 g (0.6750 – 0.9750), mientras que a los 100 dpi alcanzó 1.917 g (0.5000 – 3.025). Se encontraron diferencias significativas entre el grupo sano y de la fase crónica de los animales infectados.

El peso del ganglio linfático poplíteo en animales sanos fue de $0.0208 \text{ g} \pm 0.0022$. A los 70 dpi se observó un aumento significativo a $0.0850 \text{ g} \pm 0.0099$, y a los 100 dpi se mantuvo elevado ($0.0750 \text{ g} \pm 0.0076$). Ambos puntos de la fase crónica fueron significativamente diferentes respecto al control sano.

El peso del bazo en animales sanos fue de $0.1048 \text{ g} \pm 0.0016$. A los 70 dpi se observó un incremento a $0.4977 \text{ g} \pm 0.0650$, y a los 100 dpi se encontró un aumento ($0.5660 \text{ g} \pm 0.1468$).

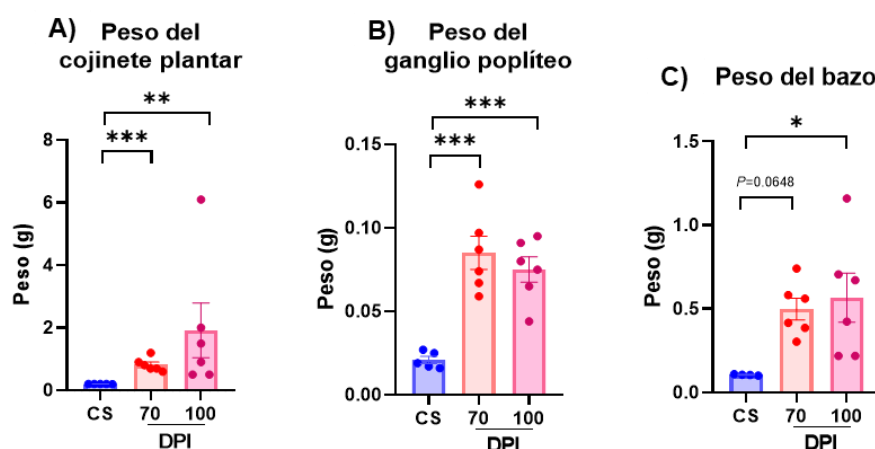


Figura 14. Peso de los tejidos obtenidos del modelo experimental de actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*

A) Peso del cojinete plantar. B) Peso del ganglio linfático poplíteo. C) Peso del bazo. (n=6 por grupo). Los datos fueron agrupados a partir de dos experimentos independientes y se presentan como media $\pm$ SEM. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis con post-hoc de Dunn para el cojinete plantar (A) y mediante ANOVA de una vía con post-hoc de Tukey para el ganglio linfático y el bazo (B y C). DPI= días post infección; CS= control sano

8.2 Cuantificación de la carga bacteriana de *N. brasiliensis* en el tejido infectado

Se cuantificaron las UFC/g de *N. brasiliensis* en el cojinete plantar de los animales infectados. En los controles sanos no se detectaron UFC (Figura 15. Carga bacteriana de *N. brasiliensis* en el cojinete plantar).

A los 70 dpi, la carga bacteriana fue de 133.0 UFC/g (66.7 – 141.5). A los 100 dpi, se observó un aumento sustancial de la carga bacteriana, alcanzando 2170 UFC/g (1458 – 2170). Se encontró una diferencia significativa entre ambos grupos de la fase crónica.

Es importante destacar que el aspecto externo de la lesión observada macroscópicamente no refleja los cambios en la carga bacteriana interna del tejido.

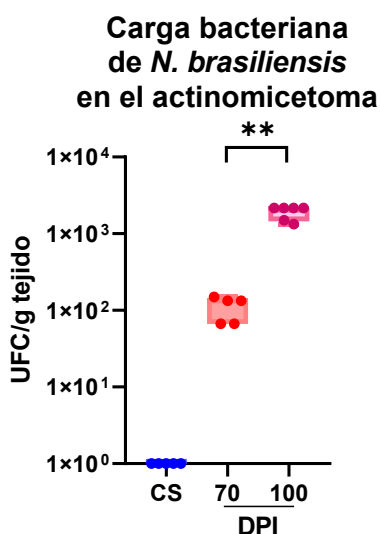


Figura 15. Carga bacteriana de *N. brasiliensis* en el cojinete plantar

Cuantificación de la carga bacteriana a los 100 dpi en comparación con los 70 dpi. (n=6 por grupo). Los datos fueron agrupados a partir de dos experimentos independientes. Los datos se presentan como mín y máx. La comparación estadística se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney. DPI= días post infección; CS= control sano.

8.3 Evaluación histopatológica del actinomicetoma en el modelo experimental

Patólogos certificados, cegados a los grupos experimentales, evaluaron las lesiones en ocho campos por muestra y asignaron un sistema de puntuación semicuantitativo.

No se observaron cambios en la proporción del infiltrado celular entre ambos tiempos de la fase crónica. Tanto a los 70 como a los 100 dpi, se observó un alto número de células PMN en la lesión, acompañado de un escaso infiltrado de células mononucleares en todos los tiempos evaluados. Se reportó un aumento significativo entre los 70 y 100 dpi en los siguientes hallazgos patológicos: necrosis, paniculitis, inflamación perineural, número de microabscesos y granos bacterianos (Figura 16. Evaluación semicuantitativa de hallazgos patológicos en el tejido infectado con *N. brasiliensis*).

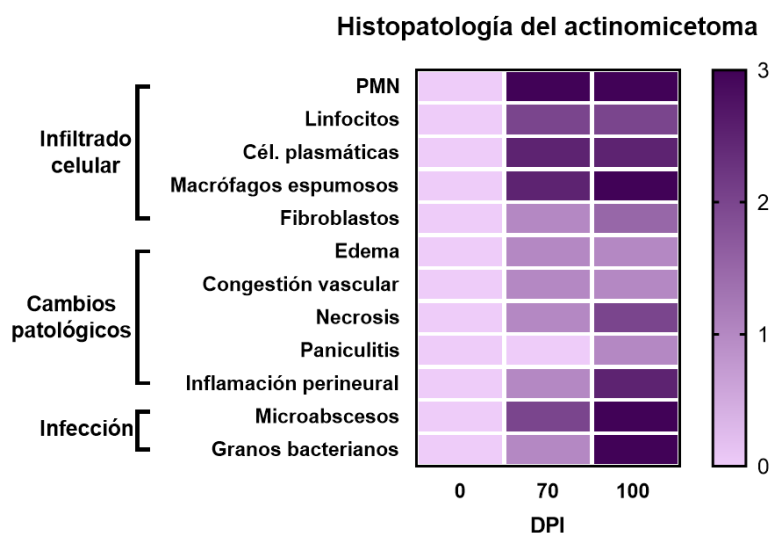


Figura 16. Evaluación semicuantitativa de hallazgos patológicos en el tejido infectado con *N. brasiliensis*

La puntuación se asignó según: ausencia (0), escasa (+=1), moderada (++=2) y abundante (+++=3). n=6 por grupo, dos experimentos independientes. Se presentan las

medias de cada grupo. Comparación estadística empleando ANOVA de dos vías. DPI= días post infección.

8.3.1 Organización arquitectónica de los microabscesos granulomatosos en el curso natural de la infección

Con la finalidad de caracterizar los mecanismos de compartimentalización e histogénesis lesional en condiciones basales, se analizaron los focos inflamatorios dérmicos en los animales durante la etapa crónica de la infección.

El escrutinio histopatológico demostró que el sistema inmune del hospedero retiene la capacidad de estructurar una respuesta granulomatosa crónica altamente organizada y circunscrita (Figura 17. Microabsceso granulomatoso crónico por *N. brasiliensis* en el modelo de actinomicetoma).

Los microabscesos examinados se localizaron en la dermis reticular y el plano hipodérmico adyacente. Presentaron una disposición arquitectónica concéntrica y simétrica delimitada. En el centro lesional se identificaron granos bacterianos de morfología lobulada, compactos y de aspecto anfófilo a eosinófilo.

Inmediatamente adyacente a la periferia de la lesión, se observó un núcleo hipercelular denso compuesto por leucocitos PMN en diferentes estadios de degeneración y cariorrexis. También se identificó un notorio anillo periférico, ópticamente claro, que circunscribía de manera continua a este foco central. Este cinturón hialino corresponde a la acumulación y ordenamiento concéntrico de macrófagos hipertróficos con diferenciación a célula espumosa, marcando la interfase de transición hacia la cronicidad organizada.

Finalmente, el límite externo del microabsceso estuvo constituido por una densa cápsula de infiltrado mononuclear, compuesta de forma mixta por linfocitos, células plasmáticas diferenciadas y fibroblastos estromales.



Figura 17. Microabsceso granulomatoso crónico por *N. brasiliensis* en el modelo de actinomicetoma

Tinción con H&E (40X). Micrografía representativa de la arquitectura compartimentalizada del microabsceso. Barra de escala: 200 µm.

8.3.2 Fenómeno Splendore - Hoespli en la periferia del grano bacteriano

En el análisis histopatológico del núcleo lesional, se constató la presencia del grano bacteriano característico de la infección por *N. brasiliensis*, constituido por un conglomerado central denso de naturaleza anfófila a predominantemente basófila.

En la periferia inmediata de esta estructura bacteriana, se identificó de forma nítida la instauración del fenómeno de Splendore-Hoespli (Figura 18. Fenómeno de Splendore-Hoespli). Este rasgo inmunopatológico se caracteriza por el depósito concéntrico y continuo de un material acelular, homogéneo y fuertemente eosinófilo, que se organiza en proyecciones radiales bien delimitadas, en forma de clavos o mazas.

Dicha corona hialina periférica delimita la interfase entre los filamentos actinomicetales y el microambiente celular del hospedero, correspondiendo a la precipitación masiva de complejos inmunes, proteínas de la cascada del complemento y glucoproteínas derivadas del estroma tisular.

Rodeando de forma difusa a esta barrera acelular, se observó un denso infiltrado inflamatorio supurativo compuesto predominantemente por PMN. Asimismo, en el espacio intersticial adyacente a la corona de Splendore-Hoespli, se apreció una matriz laxa con material fibrilar eosinófilo tenue.

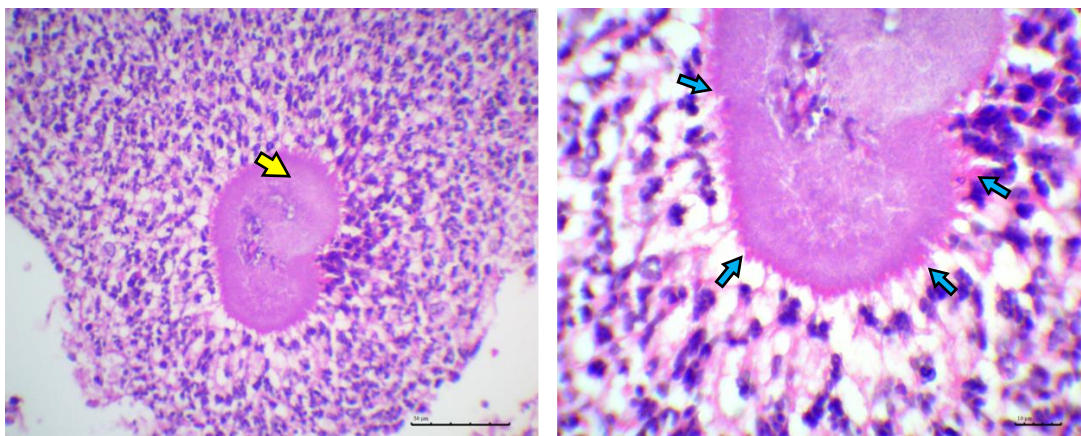


Figura 18. Fenómeno de Splendore-Hoeppli

Tinción con H&E (40X y 100x). Izq: El grano bacteriano se caracteriza por una matriz densa correspondiente a los conglomerados de filamentos bacterianos ramificados (flecha). Der: Aumento de la micrografía evidencia el detalle del fenómeno mencionado (flechas azules). Barra de escala: A = 50 μ m; B = 10 μ m.

8.3.3 Necrosis central en el grano bacteriano

Con la finalidad de caracterizar el núcleo de la infección y la magnitud del daño tisular focalizado, se examinaron las áreas centrales de los microabscesos. El análisis histopatológico confirmó de manera consistente la instauración de un proceso de necrosis supurativa central, el cual sustituye por completo la arquitectura del estroma nativo de la dermis del hospedero (Figura 19. Foco de necrosis supurativa central).

Se documentó la formación de áreas ópticamente pálidas, ricas en material amorfo y restos de membranas.

Rodeando estos focos infecciosos de forma concéntrica, se constató un denso y masivo manto celular purulento. Esta población protectora está integrada por millones de leucocitos PMN en diferentes estadios celulares, que muestran, de forma generalizada, condensación nuclear (picnosis) y fragmentación cromatínica difusa (cariorraxis).

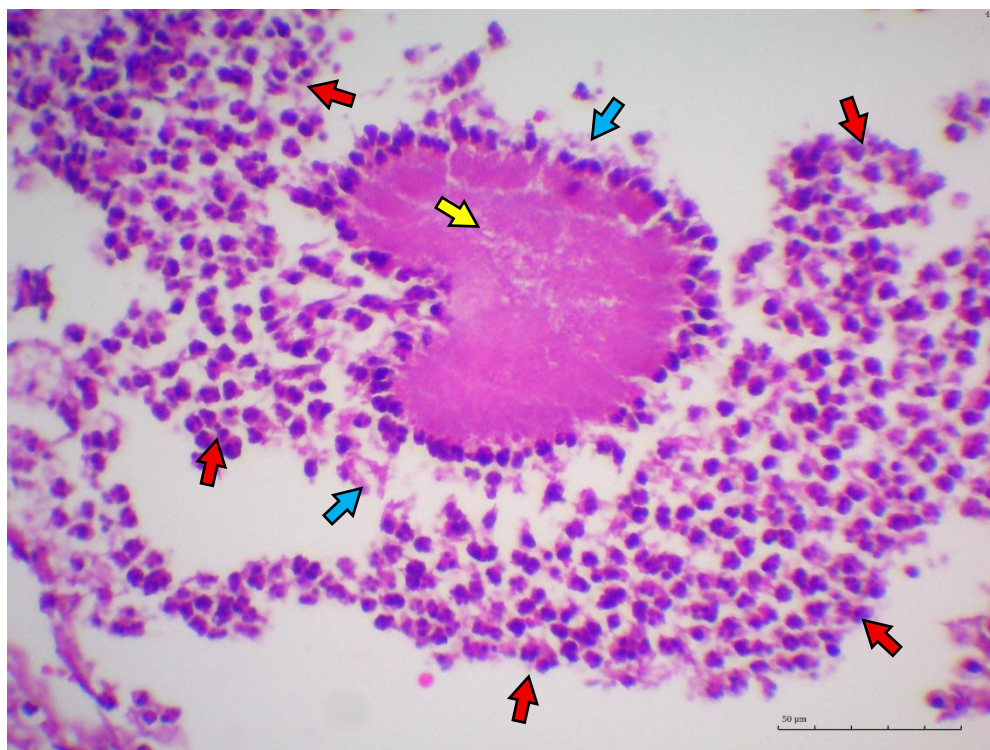


Figura 19. Foco de necrosis supurativa central

Tinción con H&E (40X). Centro necrótico, hipertrófico y compacto, que exhibe un grano bacteriano de *N. brasiliensis* (flecha amarilla), rodeado por un halo de licuefacción tisular y detritos celulares (flechas azules), delimitado externamente por una densa masa de PMN en degeneración (flechas rojas). Barras de escala: 50 μ m.

8.3.4 Infiltrado denso de leucocitos PMN en el núcleo de la lesión

Las células se localizan en la periferia del grano actinomicótico, que estuvo constituido por una densa masa celular de PMN (Figura 20. Infiltrado de PMN en el núcleo lesional).

Estas células efectoras presentaron núcleos basófilos intensos con la configuración estructural típica de la especie murina, destacando formas en anillo, bandas complejas y segmentos interconectados.

El análisis detallado de este infiltrado reveló un estado de activación y degeneración celular generalizado, evidenciado por la pérdida de la integridad de los límites citoplasmáticos en múltiples células y la presencia difusa de cuerpos apoptóticos, núcleos picnóticos y fragmentos de cromatina libre (cariorrhexis) en el espacio intersticial.

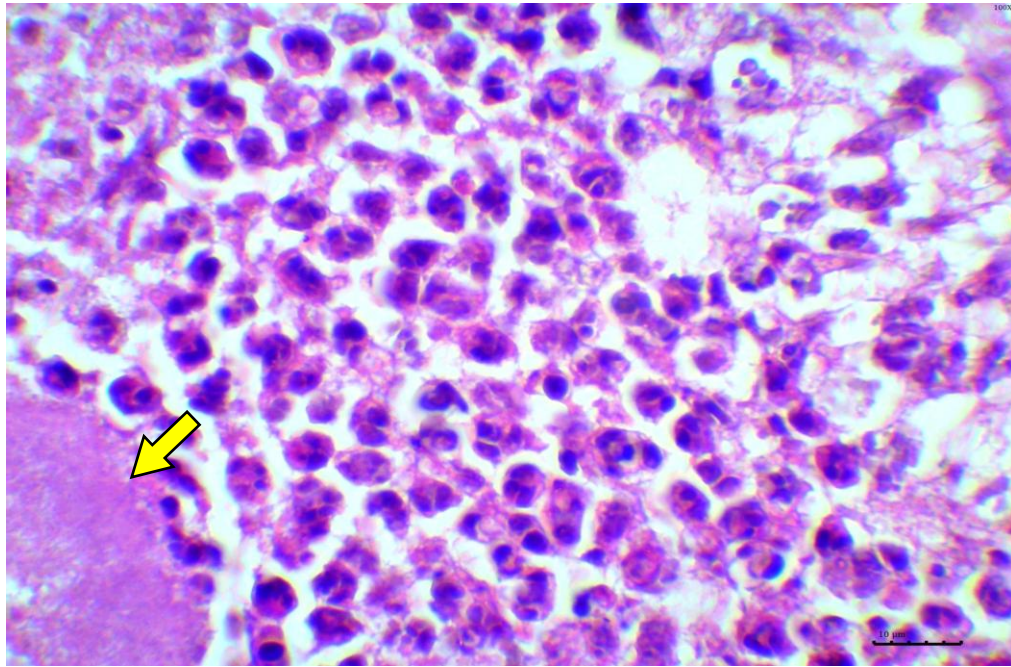


Figura 20. Infiltrado de PMN en el núcleo lesional

Tinción con H&E (100X). Se ilustra la respuesta inmune innata celular adyacente al grano bacteriano (flecha amarilla). Barra de escala: 10 μ m.

8.3.5 Infiltrado leucocitario mixto con presencia de granulocitos y células mononucleares

Paralelamente, en los bordes de disociación tisular (Figura 21. Infiltrado mononuclear mixto y evidencia de degranulación), el infiltrado mononuclear se mostró de carácter mixto, compuesto por linfocitos de núcleo denso y macrófagos tisulares.

Esta respuesta celular coexistió con evidencias de activación de linajes granulocíticos de la inmunidad innata, demostrada mediante el hallazgo intersticial difuso de gránulos libres densamente eosinófilos y refringentes, compatibles con eventos de degranulación masiva de eosinófilos y/o células cebadas locales.

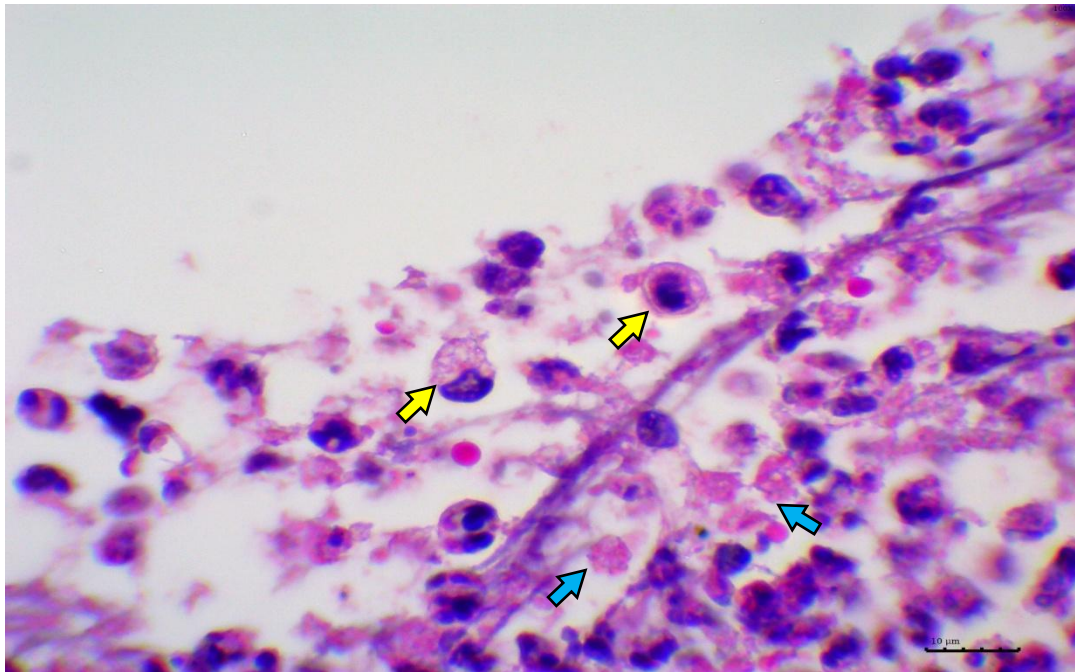


Figura 21. Infiltrado mononuclear mixto y evidencia de degranulación

Tinción con H&E (100X). Se aprecian leucocitos mononucleares (flechas amarillas) y cuerpos esféricos eosinófilos, indicativos de la degranulación de las poblaciones granulocíticas de la inmunidad innata (flechas azules). Barra de escala: 10 µm.

8.3.6 Infiltrado mononuclear perilesional

Con el propósito de evaluar la celularidad involucrada en la contención del granuloma actinomicótico, se analizaron las áreas periféricas a los granos bacterianos (Figura 22. Respuesta de macrófagos espumosos).

De manera consistente en los diferentes especímenes evaluados, se constató la formación de un cinturón celular compuesto por macrófagos hipertróficos con

diferenciación hacia una morfología espumosa. Estas poblaciones histiocíticas de la inmunidad innata celular se localizaron estratégicamente delimitando el núcleo supurativo denso.

A nivel estructural, las células presentaron un aumento del citoplasma, caracterizado por un patrón reticular ópticamente vacío o en encaje. Los núcleos de estos macrófagos espumosos presentaron morfologías ovoides o circulares, de localización central o excéntrica.

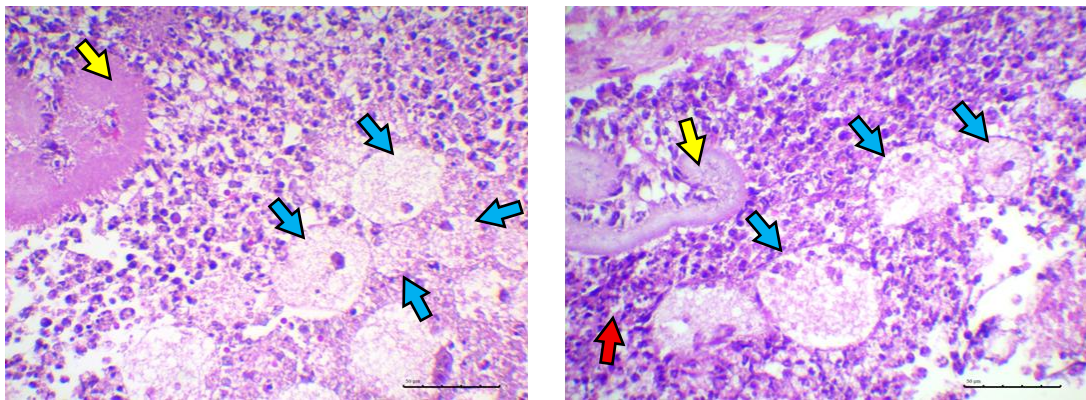


Figura 22. Respuesta de macrófagos espumosos

Tinción con H&E (40X). Se observa el cinturón de macrófagos espumosos en dos especímenes independientes del modelo de actinomicetoma. Izq: Organización concéntrica de macrófagos espumosos hipertróficos con citoplasma vacuolado en encaje (flechas azules), adyacentes a un grano bacteriano (flecha amarilla). Der: Linaje histiocítico espumoso en un segundo individuo, destacando la morfología celular circular bien delimitada y la persistencia de núcleos densos centrales o desplazados, rodeados por un infiltrado supurativo denso perilesional (flecha roja). Barras de escala: 50 μ m.

En las zonas perilesionales estromales (Figura 23. Infiltrado mononuclear perilesional), se identifican células que coinciden con la morfología de células plasmáticas. Estas poblaciones presentaron citoplasmas eosinófilos amplios con un notorio halo claro

perinuclear y núcleos excéntricos con condensación cromatínica periférica en configuración de rueda de carro.

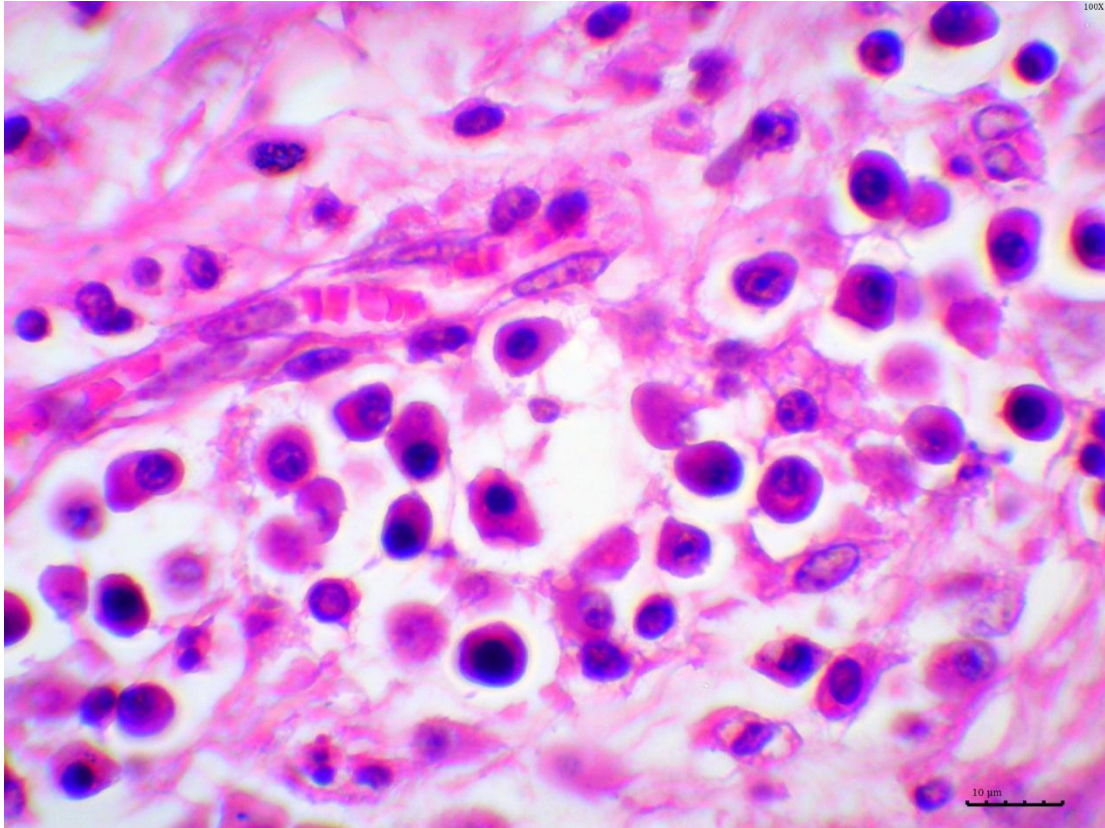


Figura 23. Infiltrado mononuclear perilesional

Tinción con H&E (100X). En la periferia del granuloma se observan células mononucleares. Barra de escala: 10 µm.

8.3.7 Interfase dermo-epidérmica, reclutamiento e infiltración por granulocitos

Con el fin de caracterizar los fenómenos de reclutamiento celular y las alteraciones en el estroma adyacente a la barrera cutánea, se examinó la zona de transición dermo-epidérmica (Figura 24. Interfase dermo-epidérmica, reclutamiento vascular e infiltración por granulocitos).

En los sectores vasculares periféricos a la lesión, se identificaron vénulas poscapilares marcadamente dilatadas, con evidencia de reclutamiento leucocitario.

En el compartimento estromal adyacente, la matriz extracelular se mostró laxa y edematosa, sirviendo de soporte para un infiltrado inflamatorio difuso compuesto predominantemente por PMN.

Finalmente, se constató la preservación estructural del epitelio escamoso estratificado correspondiente a la epidermis; no obstante, se apreció la migración y el asentamiento focal de los granulocitos en la zona de la membrana basal epitelial.

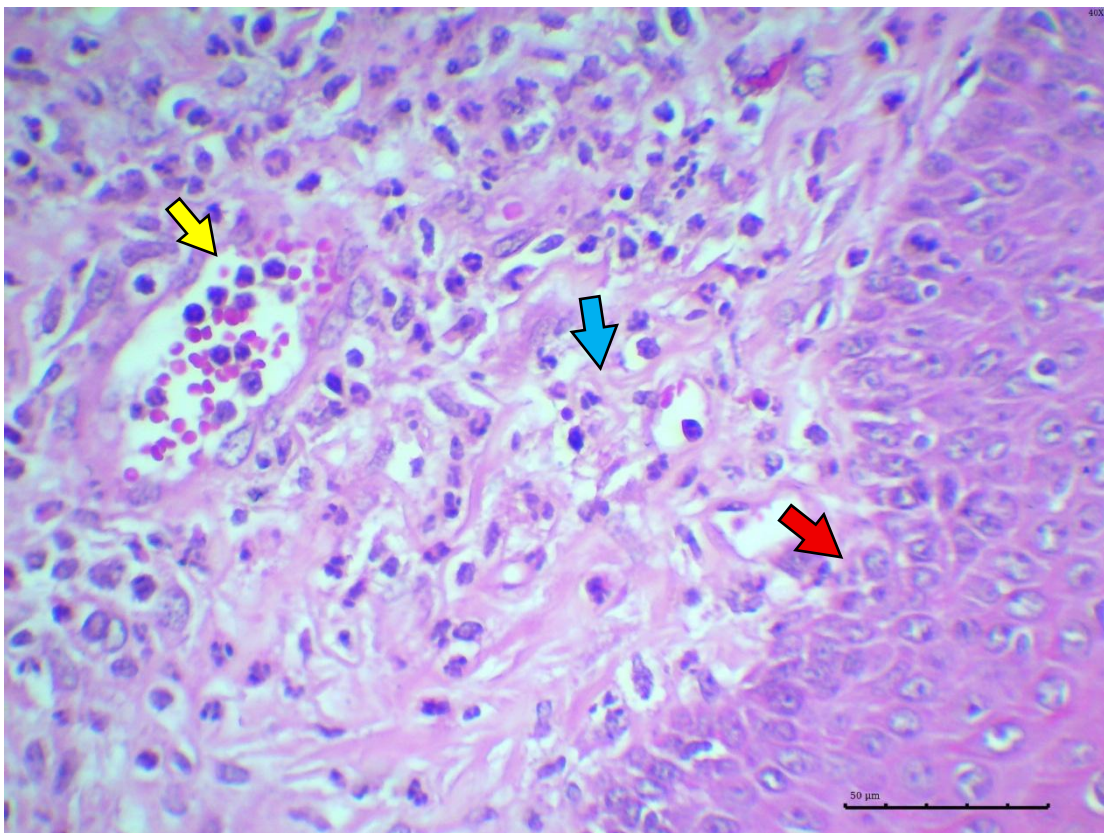


Figura 24. Interfase dermo-epidérmica, reclutamiento vascular e infiltración por granulocitos

Tinción con H&E (40X). Izq.: se delimita una estructura vascular que exhibe fenómenos de migración leucocitaria (flecha amarilla). Centro: el estroma dérmico laxo

muestra un infiltrado celular difuso (flecha azul). Der.: se aprecia la arquitectura organizada del epitelio escamoso estratificado (flecha roja). Barra de escala: 50 μ m.

8.3.8 Respuesta fibroblástica en el modelo de actinomicetoma

Se analizaron los sectores de proliferación conectiva dérmica. Por una parte, se identificaron zonas de encapsulación y fibrosis dérmica madura organizadas de forma adyacente a los frentes epiteliales (Figura 25. Espectro morfológico de la respuesta fibroblástica y remodelación estromal).

Este microambiente se caracterizó por el depósito masivo y compacto de haces de colágeno densamente eosinófilos dispuestos de forma paralela a la superficie cutánea. Inmersos en esta matriz, se constataron poblaciones estromales en estadios avanzados de maduración, morfológicamente compatibles con fibrocitos, definidos por núcleos fusiformes delgados altamente condensados y elongados.

Por otra parte, en áreas de invasión activa y disociación estromal profunda (Figura 25. Espectro morfológico de la respuesta fibroblástica y remodelación estromal) se evidenció la instauración de un tejido de granulación. A diferencia de las zonas fibróticas densas, esta matriz se encontró laxa y edematosa, con depósitos desorganizados de colágeno. En este sector, los fibroblastos exhibieron una morfología activada (miofibroblastos), caracterizada por un incremento en el tamaño celular, citoplasma ramificado y núcleos ovoides vesiculosos de cromatina laxa.

Esta respuesta proliferativa celular coexistió de manera estrecha con eventos de neovascularización, documentados mediante la proliferación de yemas endoteliales y

capilares de neoformación delgados, así como con un infiltrado persistente de células inflamatorias mononucleares.

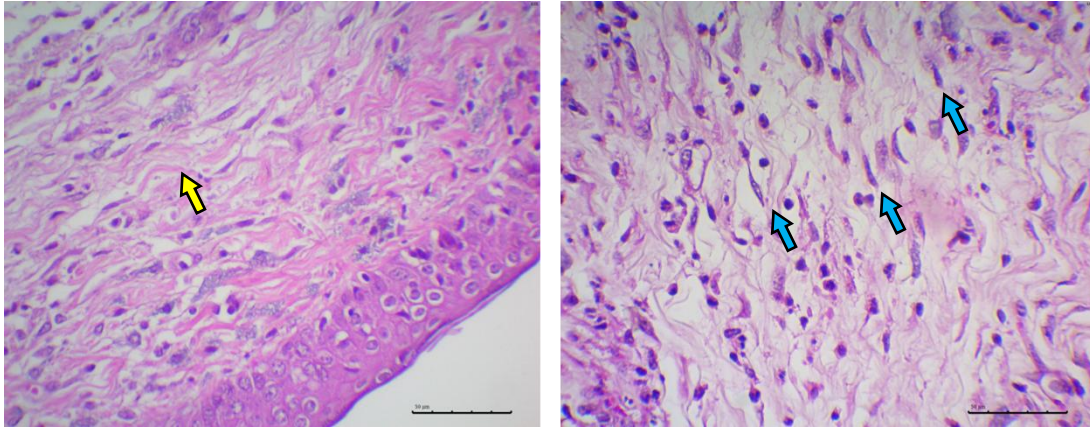


Figura 25. Espectro morfológico de la respuesta fibroblástica y remodelación estromal

Tinción con H&E (40X). Se presentan los dos estadios de la remodelación de la matriz extracelular dérmica. Izq: Zona de fibrosis dérmica compacta (flecha amarilla). Der: Tejido caracterizado por fibroblastos de núcleos vesiculosos ovoides (flechas azules). Barras de escala: 50 µm.

8.3.9 Edema intersticial en la dermis

Se evaluaron los cambios en la matriz conectiva dermo-hipodérmica. Se documentó la presencia de edema intersticial en la matriz dérmica de los animales infectados (Figura 26. Edema en la dermis profunda).

Este fenómeno se caracterizó por en una pérdida de la compactación y homogeneidad del tejido, exhibiendo haces de colágeno dérmico y subcutáneo. Histológicamente, esta alteración de la barrera endotelial se constató mediante la presencia de vasos ectásicos y congestionados adyacentes a las zonas de mayor laxitud.

Asimismo, el análisis del estroma reveló que el líquido de edema no se distribuye de forma aislada, sino que diseca los planos tisulares profundos.

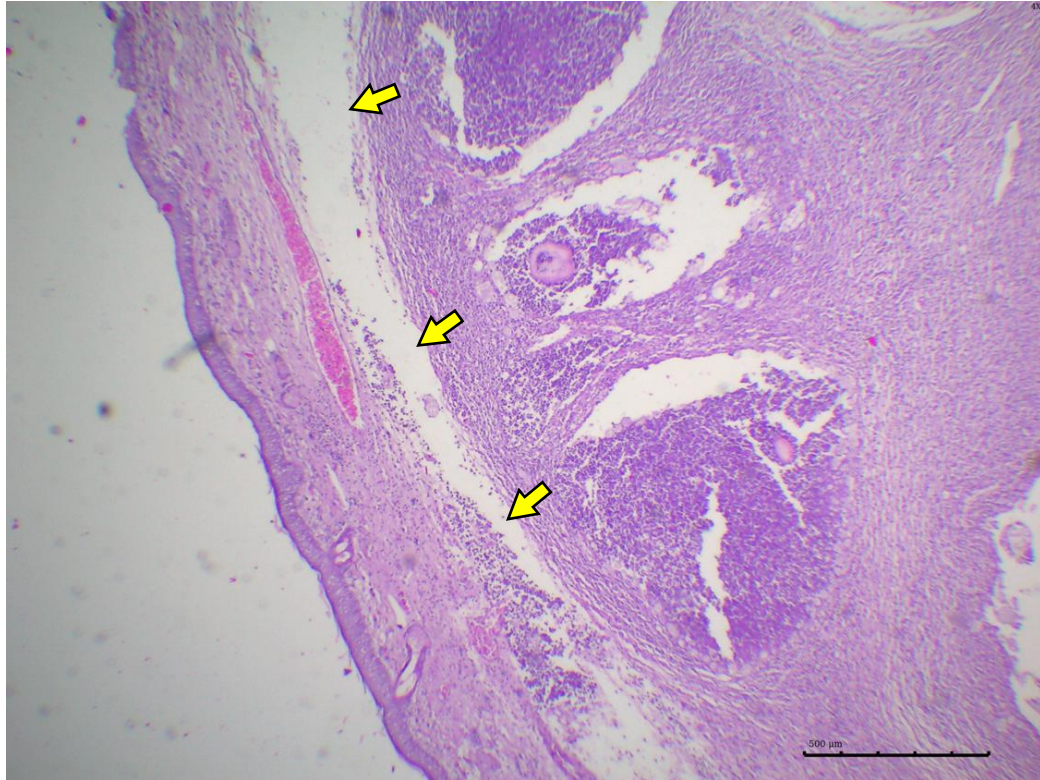


Figura 26. Edema en la dermis profunda

Tinción con H&E (4X). Edema evidenciado por la separación de los haces de colágeno y el aspecto laxo del estroma (flechas amarillas). Barra de escala: 500 μm .

8.3.10 Congestión vascular perilesional

Se evaluó el lecho vascular perilesional y se demostró la vasodilatación y congestión vascular generalizada que compromete de forma simultánea a los compartimentos arterial, capilar y venuloso en el estroma de los animales infectados (Figura 27. Lecho vascular periférico al actinomicetoma).

En los vasos arteriales aferentes, se identificaron arteriolas con tunicas medias musculares conservadas, pero con luces ectásicas y totalmente empaquetadas por masas compactas de eritrocitos refringentes.

De manera paralela, los compartimentos venosos de capacitancia y las vénulas poscapilares presentaron dilatación luminal con atrapamiento eritrocitario.

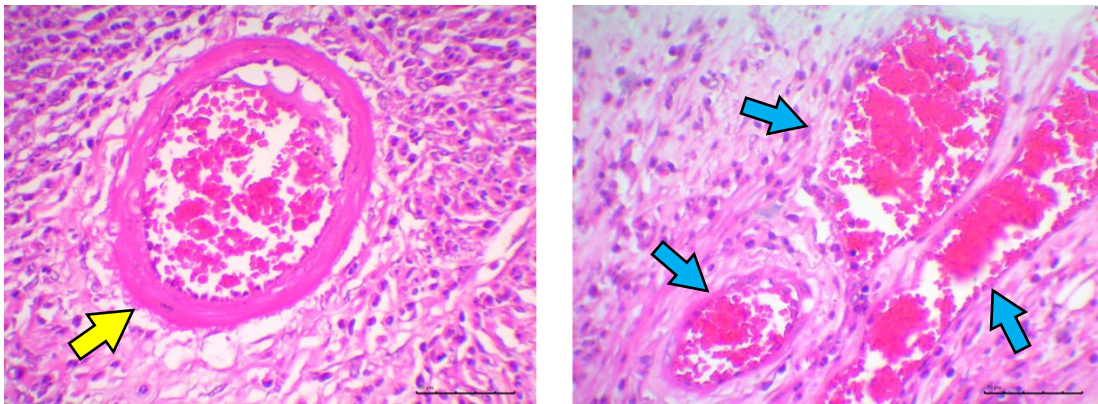


Figura 27. Lecho vascular periférico al actinomicetoma

Tinción con H&E (40X). Representación del estado de congestión generalizada en el estroma perilesional. Der: Arteriola cutánea de túnica media muscular prominente, con luz distendida y un denso agregado de eritrocitos, rodeada por un infiltrado inflamatorio (flecha amarilla). Izq: Compromiso difuso del lecho vascular (flechas azules) en un estroma dérmico infiltrado. Barras de escala: 50 µm.

8.3.11 Paniculitis hipodérmica

Con el objetivo de esclarecer la progresión anatómica de la infección hacia los compartimentos subcutáneos y evaluar el daño tisular en la grasa perilesional, se analizaron los sectores hipodérmicos mediante cortes seriados (Figura 28. Espectro anatómico de la paniculitis hipodérmica).

Se observó un espectro de paniculitis mixta que se extiende desde los septos conectivos hasta los lobulillos adiposos. El infiltrado inflamatorio denso diseca las uniones conectivas interlobulillares de la hipodermis profunda, extendiéndose verticalmente hacia la dermis reticular y la papilar subepitelial.

Esto se observó con mayor definición compartimental en las fases septales de la lesión. En estos sectores, los lobulillos grasos se presentaron inicialmente confinados y delimitados por un denso infiltrado purulento.

Finalmente, se confirmó la transición hacia una paniculitis lobulillar difusa y severa. Los leucocitos PMN y células mononucleares se observaron en el espacio intersticial del lobulillo, disecando de forma individualizada las membranas celulares de los adipocitos.

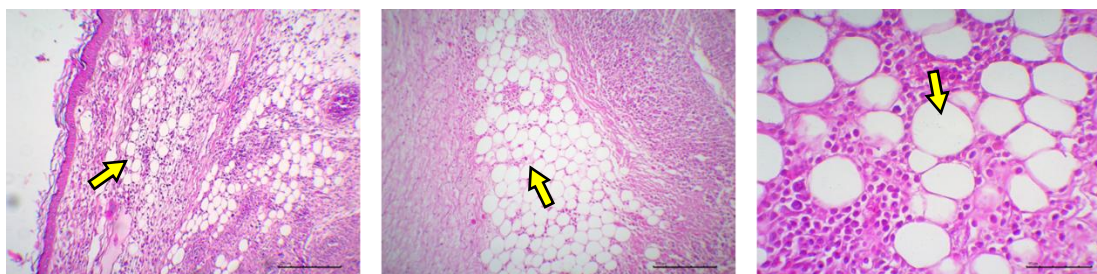


Figura 28. Espectro anatómico de la paniculitis hipodérmica

Tinción con H&E (10X y 40X). Izq: Lobulillos grasos adyacentes a la barrera dérmica. Centro: Paniculitis septal. Der: Paniculitis lobulillar. (Flechas amarillas). Barras de escala: A y B = 200 μ m; C = 50 μ m.

8.3.12 Infiltración celular perineural

Se examinaron los trayectos nerviosos subcutáneos adyacentes al foco inflamatorio con el propósito de determinar el grado de afección del sistema nervioso periférico (Figura 29. Compromiso neurovascular e infiltración inflamatoria perineural).

Se identificaron cordones nerviosos de trayecto hipodérmico, delimitados por un infiltrado inflamatorio celular concéntrico al perineuro.

Esta afección perineural coexistió estrechamente con alteraciones en los vasos sanguíneos que conforman los vasa nervorum locales. Los espacios vasculares adyacentes a los trayectos nerviosos presentaron ectasia y congestión vascular masivas, con espacios saturados de eritrocitos.

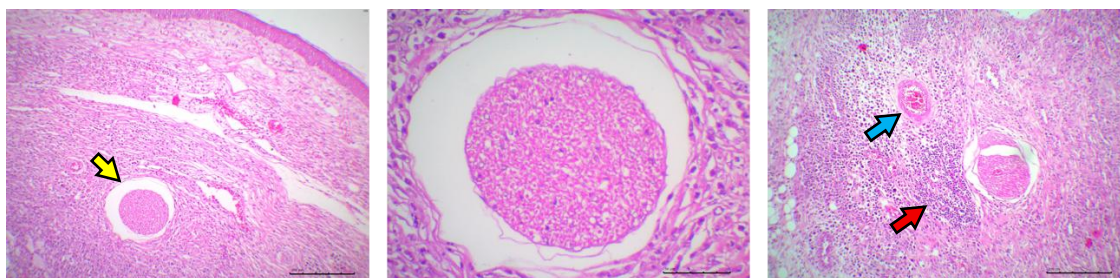


Figura 29. Compromiso neurovascular e infiltración inflamatoria perineural

Tinción con H&E (10X y 40X). Izq: Filete nervioso periférico hipodérmico (flecha amarilla) rodeado por un denso frente de infiltrado leucocitario celular. Centro: Detalle del mismo filete nervioso. Der: Congestión vascular (flecha azul) e infiltración inflamatoria perineural (flecha roja). Barras de escala: A y C = 200 μ m; B = 50 μ m

8.3.13 Compromiso osteoarticular

Se evaluaron los planos anatómicos profundos del miembro infectado. En los sectores subyacentes al foco purulento principal, se documentó el bloqueo directo de estructuras esqueléticas pequeñas en proceso de remodelación, compatibles con cortes

transversales de elementos falángicos u óseos sésiles. Estas piezas anatómicas presentaron un núcleo central basófilo de cartílago hialino con condrocitos viables distribuidos en sus lagunas de matriz extracelular, delimitados por una corteza periférica eosinófila y un canal de invasión vascular (Figura 30. Estructuras osteocartilaginosas profundas).

El elemento osteocartilaginoso se encuentra completamente rodeado, de forma concéntrica, por un denso y masivo manto hiper celular de infiltrado inflamatorio.



Figura 30. Estructuras osteocartilaginosas profundas

Tinción con H&E (10X y 40X). Elemento esquelético murino de morfología circular en proceso de osificación endocondral, compuesto por un núcleo de cartílago hialino (flecha amarilla) con condrocitos en lagunas (flecha azul). Barra de escala: 200 µm.

8.3.14 Osteomielitis crónica y remodelación ósea

El análisis del compartimento esquelético central en los animales confirmó la formación de un proceso de osteomielitis supurativa (Figura 31. Espectro

histopatológico de osteomielitis supurativa crónica y remodelación ósea destructiva profunda).

La respuesta inmune celular invade el tejido óseo compacto y esponjoso de las falanges y metatarsos murinos. A nivel intramedular, se documentó la pérdida de la arquitectura de la médula ósea hematopoyética y de la grasa nativa. Los espacios intertrabeculares se observaron obliterados y reemplazados por un manto hiper celular, constituido por leucocitos PMN, monocitos y detritos celulares.

La matriz ósea mineralizada presentó fenómenos de osteólisis y resorción ósea activa. Las trabéculas óseas residuales exhibieron bordes irregulares, delgados y festoneados, con la presencia conspicua de lagunas de reabsorción. Este frente lítico provocó la fragmentación y el aislamiento de espículas de matriz calcificada necrótica, configurando la formación de secuestros óseos inmersos en el material purulento.

Asimismo, el tejido óseo cortical evidenció pérdida de continuidad y signos microscópicos de microfracturas trabeculares secundarias a la desmineralización. Se identificaron focos periféricos de reacción perióstica e hileras de osteoblastos.

Las trabéculas de hueso esponjoso perdieron su revestimiento celular perióstico normal y exhibieron signos de osteólisis y erosión ósea, manifestados a través de bordes adelgazados e irregulares. Los espacios medulares trabeculares se presentaron totalmente reemplazados por densas masas de infiltrado inflamatorio hiper celular.

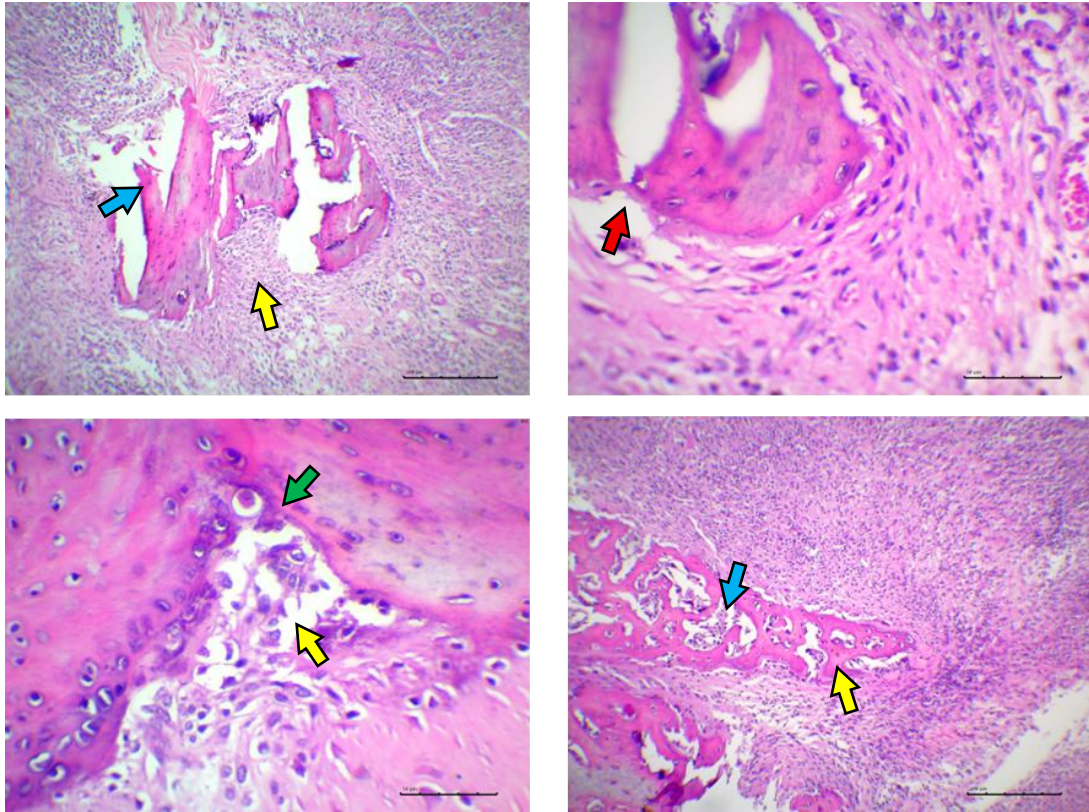


Figura 31. Espectro histopatológico de osteomielitis supurativa crónica y remodelación ósea destructiva profunda

Tinción con H&E (10X). Arriba izq: Infiltración leucocitaria difusa y obliteración total de los espacios medulares por un denso frente PMN (flecha amarilla), asociado a adelgazamiento de las trabéculas óseas (flecha azul). Arriba der: Fenómenos de osteólisis y erosión de la matriz cortical con presencia de lagunas de reabsorción e islotes óseos residuales (flecha roja). Abajo izq: Interfase de destrucción tisular profunda donde coexisten frentes de necrosis intramedular (flecha amarilla) y microfracturas trabeculares (flecha verde) secundarias a la pérdida de soporte mineral. Abajo der: Foco de osteomielitis supurativa crónica profunda, evidenciado por trabéculas de hueso esponjoso en proceso de erosión y osteólisis (flecha amarilla), con un reemplazo total de los espacios medulares por un infiltrado inflamatorio hipercelular (flecha azul). Barras de escala: A - C = 50 μ m; D = 200 μ m.

8.3.15 Alteraciones en el sistema musculoesquelético profundo

Se examinaron los compartimentos musculoesqueléticos subyacentes a la hipodermis (Figura 32. Miositis degenerativa y atrofia muscular). Se observó que la infección crónica induce una destrucción pantisular que lesiona gravemente las fibras musculares de la extremidad del hospedero.

En el análisis del tejido muscular esquelético en corte longitudinal se identificó miositis degenerativa. Las fibras musculares situadas en la vecindad de la infección por *N. brasiliensis* exhibieron una pérdida generalizada de sus estrías transversales homeostáticas, acompañada de vacuolización citoplasmática, hialinización del sarcoplasma y fenómenos de fragmentación celular, coexistiendo con una infiltración difusa de leucocitos PMN en el endomisio.

Esta miopatía inflamatoria se complementó con un gradiente de atrofia muscular. Las fibras musculares más distantes conservaron su morfología poligonal y empaquetamiento normal; sin embargo, a medida que los fascículos se aproximaban al frente purulento denso, sufrieron una reducción drástica y progresiva de su área transversal, adoptando configuraciones pequeñas y marcadamente anguladas.

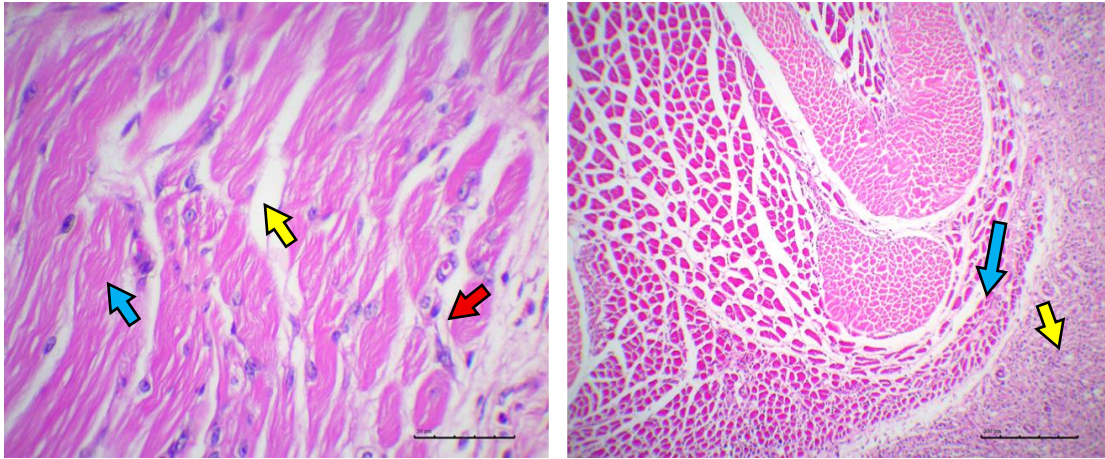


Figura 32. Miositis degenerativa y atrofia muscular

Tinción con H&E (10X y 40X). Izq: Miositis aguda en corte longitudinal, caracterizada por la pérdida de estrías, hialinización (flecha azul) y fragmentación de las fibras musculares esqueléticas (flecha amarilla), acompañadas de infiltración leucocitaria intersticial (flecha roja). Der: Gradiente de atrofia muscular en corte transversal; las fibras adyacentes al frente inflamatorio crónico (flecha azul) exhiben una reducción drástica de su diámetro y morfología angulada (flecha amarilla). Barras de escala: A = 50 μm ; B = 200 μm .

8.4 Análisis morfométrico del grano

Con la finalidad de determinar si los conglomerados bacterianos sufren modificaciones estructurales durante el curso crónico de la infección, se realizó un análisis morfométrico para evaluar el perímetro, el área y la forma de los granos de *N. brasiliensis* en la etapa crónica (Figura 33. Análisis morfométrico de los granos de *N. brasiliensis* en la fase crónica del actinomicetoma experimental).

El análisis del perímetro reveló que no hubo cambios significativos entre los 70 y 100 dpi. A los 70 dpi, el perímetro fue de 340.2 μm (242.5 – 467.6), mientras que a los 100 dpi fue de 274 μm (203.3 – 429.5). De manera similar, el área no mostró cambios significativos entre ambos tiempos: a los 70 dpi fue de 4770 μm^2 (2629 – 6305) y a los 100 dpi de 3477 μm^2 (1924 – 9191).

En contraste con el perímetro y el área, se observaron cambios significativos en la forma del grano. El índice de circularidad a los 70 dpi fue de 0.5173 (0.3584 – 0.8234), mientras que a los 100 dpi aumentó a 0.6622 (0.4698 – 0.8633), indicando una tendencia hacia una forma más redondeada. Este hallazgo sugiere que, conforme transcurre la infección en la fase crónica, ocurre una remodelación activa del grano bacteriano.

El análisis estadístico e histopatológico integrado reveló una correlación temporal significativa, demostrando que los granos bacterianos experimentan un proceso continuo de remodelación geométrica y compactación que evoluciona hacia una mayor circularidad a medida que progresa la cronicidad del modelo. A los 70 dpi, los granos bacterianos presentaron una arquitectura inmadura e irregular, caracterizada por contornos lobulados en forma de herradura u ovoides alargados. Esta morfología inicial de bajo índice de circularidad sugiere una fase de multiplicación bacteriana a través de los planos estromales de menor resistencia mecánica, donde el frente inflamatorio aún se encuentra en proceso de organización.

Hacia los 100 dpi, se documentó una fase de reorganización estructural, en la cual los granos bacterianos exhibieron una morfología predominantemente bilobulada compacta, evidenciando indicios de constricción y empaquetamiento secundario al incremento de la densidad celular del infiltrado inflamatorio circundante.

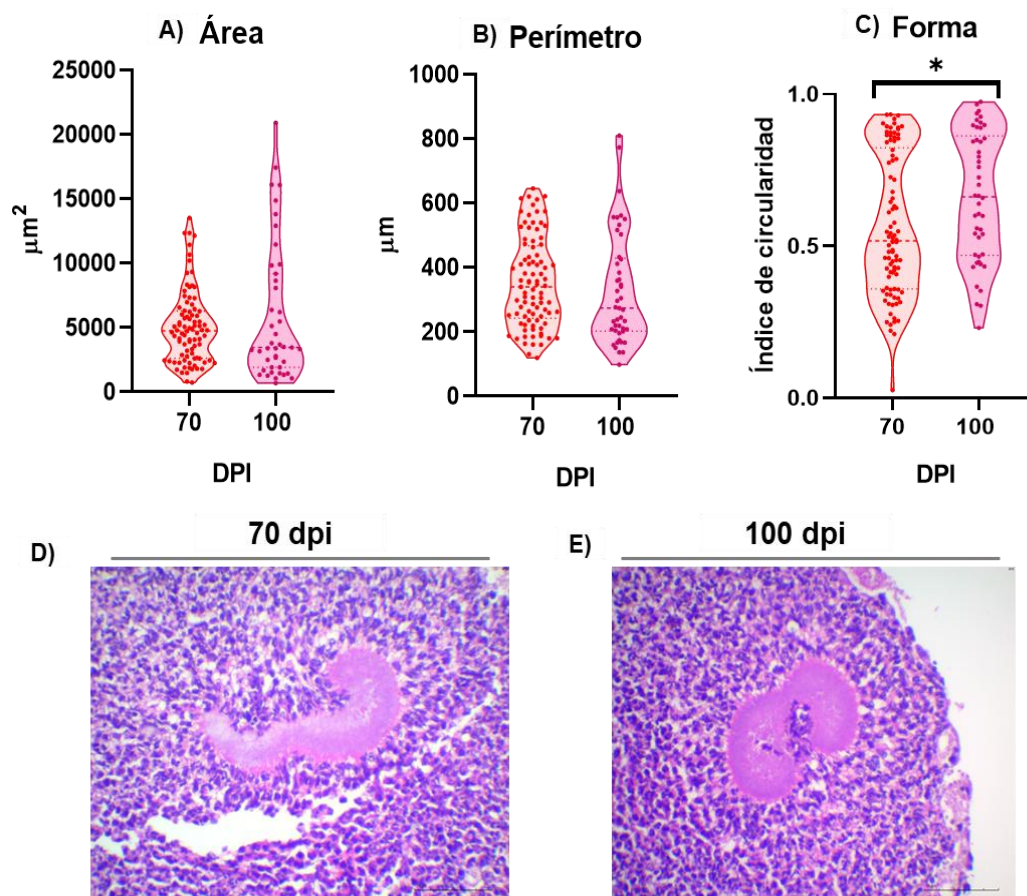


Figura 33. Análisis morfométrico de los granos de *N. brasiliensis* en la fase crónica del actinomycetoma experimental

A) Perímetro del grano a 70 y 100 dpi. (B) Área del grano a 70 y 100 dpi. (C) Índice de circularidad a 70 y 100 dpi. n=6 animales de experimentación por grupo, dos experimentos independientes. El total de estructuras analizadas: 70 dpi= 90; 100 dpi= 46. Los datos se presentan como mediana (IQR). La comparación estadística se realizó por medio de la prueba U de Mann-Whitney. D) Micrografía representativa de granos a 70 dpi mostrando arquitectura irregular y contornos lobulados. E) Micrografía representativas de granos a 100 dpi, mostrando morfología más compacta y redondeada. Tinción H&E 40X. Barra =50 μm . DPI= días post infección; CS= control sano.

8.5 Inmunofenotipo del infiltrado celular en el actinomicetoma y órganos linfoides secundarios

Se realizó el cálculo del porcentaje de linfocitos y células mieloides en el tejido infectado (cojinete plantar). No se encontró infiltrado de linfocitos T en animales sanos, por lo que las comparaciones se hicieron entre los dos puntos en el tiempo establecidos: 70 y 100 dpi (Figura 34. Inmunofenotipo del infiltrado celular en el actinomicetoma experimental por *N. brasiliensis*).

A los 70 dpi se encontró un 0.6230% (0.4660 – 1.7140) de linfocitos CD3+, mientras que a los 100 dpi fue de 0.7840% (0.5465 – 4.7710). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Los porcentajes de linfocitos CD4+ y CD8+ se calcularon con respecto al total de linfocitos CD3+. Para los linfocitos CD4+, se encontró un 71.94% (± 2.62) a los 70 dpi y un 80.42% (± 3.471) a los 100 dpi. Para los linfocitos CD8+, se encontró un 28.06% (± 2.624) a los 70 dpi y un 19.58% (± 3.471) a los 100 dpi. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las dos subpoblaciones entre ambos tiempos.

El porcentaje de neutrófilos se calculó con respecto a la población total de CD45+. En los controles sanos se encontró una cantidad mínima de células Ly6G+ (16.25% $\pm$ 4.657). A los 70 dpi se observó un aumento significativo (90.61% $\pm$ 4.082), que se mantuvo a los 100 dpi (92.89% $\pm$ 1.385). Ambos tiempos de infección fueron mayores en comparación con los valores encontrados en los controles sanos.

En contraste con los neutrófilos, se encontró una elevada proporción de macrófagos en el tejido de los controles sanos ($43.05\% \pm 8.493$). Este valor fue significativamente mayor en comparación con lo observado a los 70 dpi ($1.883\% \pm 0.6410$) y a los 100 dpi ($0.9896\% \pm 0.1980$).

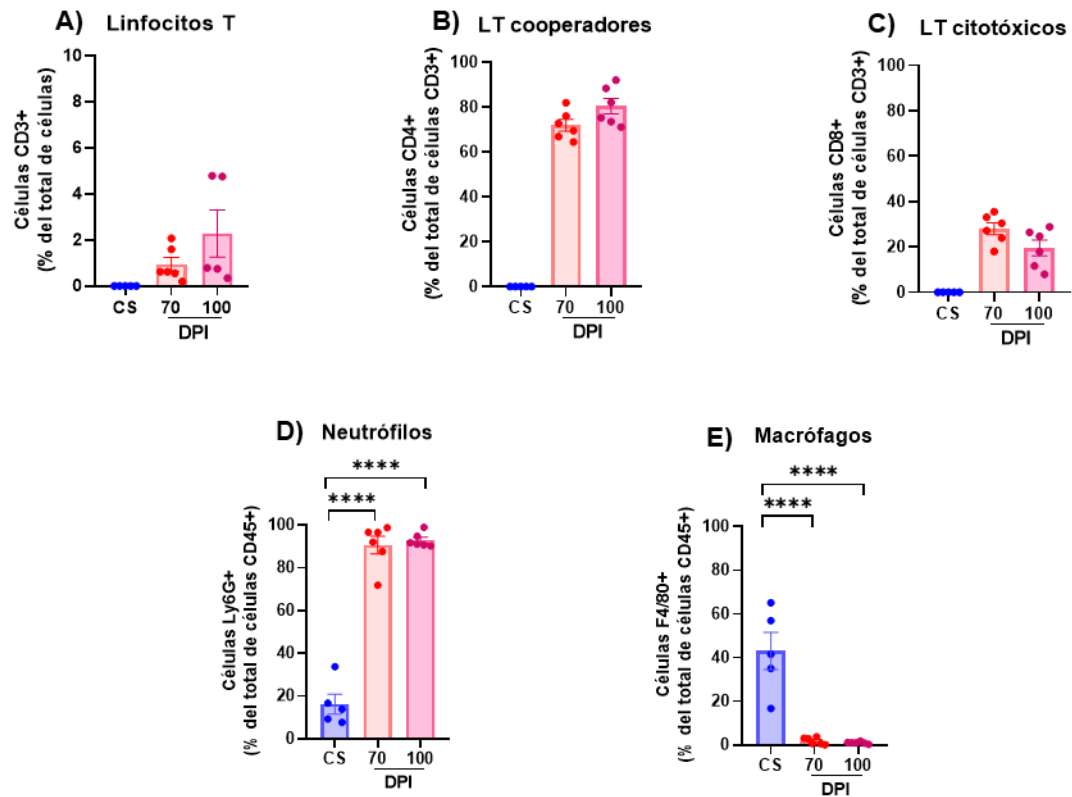


Figura 34. Inmunofenotipo del infiltrado celular en el actinomictoma experimental por *N. brasiliensis*

A) Linfocitos CD3+. B) Subpoblaciones CD4+ y CD8+. C) Neutrófilos Ly6G+. D) Macrófagos F4/80+. Los datos corresponden a n=6 animales por grupo, provenientes de dos experimentos independientes. Se realizó la prueba de U de Mann-Whitney para A. Para B y C se realizó la prueba de T de Student. Para D y E se realizó la prueba de ANOVA de una vía. Se muestra graficada la media $\pm$ SEM. DPI= días post infección; CS= control sano.

Se evaluó el inmunofenotipo de las células presentes en el ganglio linfático poplíteo drenante de la extremidad infectada (Figura 35. Inmunofenotipo de los linfocitos del ganglio linfático poplíteo en el modelo experimental de actinomicetoma por *N. brasiliensis*).

En los animales control sanos, el porcentaje de linfocitos CD3⁺ fue de 27.64% (± 1.484). A los 70 dpi se observó una disminución significativa respecto al control sano, con un valor de 8.402% (± 0.8718). Esta disminución se mantuvo a los 100 dpi, con un valor de 9.090% (± 1.856). No se observaron cambios significativos en la proporción de linfocitos CD4⁺ ni CD8⁺ a lo largo de la infección crónica. En los controles sanos, el porcentaje de linfocitos CD4⁺ fue de 76.17% (± 1.075), mientras que a los 70 dpi fue de 73.22% (± 1.643) y a los 100 dpi de 75.02% (± 1.948).

En cuanto a los linfocitos CD8⁺, los controles sanos mostraron un porcentaje de 23.83% (± 1.075), seguido de 26.78% (± 1.643) a los 70 dpi y 24.98% (± 1.948) a los 100 dpi. No se observaron diferencias entre los grupos en ninguna de las dos subpoblaciones. Cabe señalar que, para este órgano, no se analizaron las poblaciones mieloides.

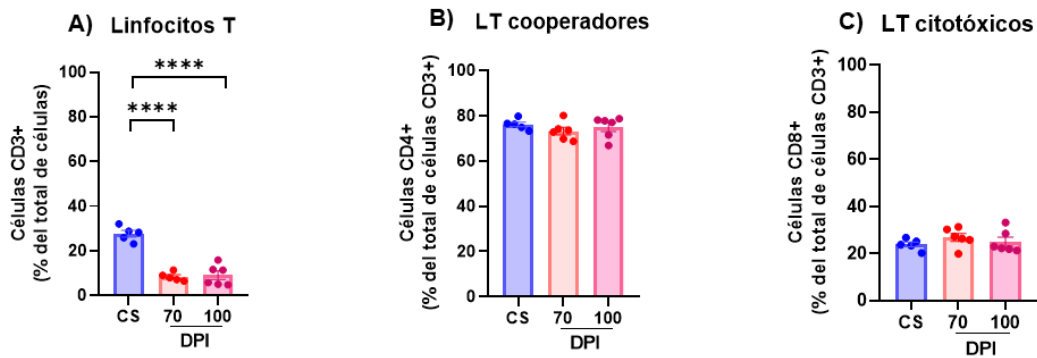


Figura 35. Inmunofenotipo de los linfocitos del ganglio linfático poplíteo en el modelo experimental de actinomycetoma por *N. brasiliensis*

A) Linfocitos CD3+. B) Subpoblaciones CD4+ y CD8+. C) Neutrófilos Ly6G+. D) Macrófagos F4/80+. Los datos corresponden a n=6 animales por grupo, provenientes de dos experimentos independientes. Se realizó la prueba de U de Mann-Whitney para A. Para B y C se realizó la prueba de T de Student. Para D y E se realizó la prueba de ANOVA de una vía. Se muestra graficada la media $\pm$ SEM. DPI= días post infección; CS= control sano.

Se evaluó el inmunofenotipo de las células presentes en el bazo (Figura 36. Inmunofenotipo de las células del bazo en el modelo experimental de actinomycetoma por *N. brasiliensis*)

El porcentaje de linfocitos T CD3+ disminuyó con el tiempo. Los controles sanos presentaron 27.64% (± 1.484), mientras que a los 70 dpi disminuyó a 8.402% (± 0.8718) y a los 100 dpi se mantuvo en 9.090% (± 1.856).

En el caso de los linfocitos CD4+, se observó un aumento del porcentaje con el paso de la infección. Los controles sanos mostraron 69.02% (± 2.372), aumentando a 78.22% (± 1.265) a los 70 dpi y a 81.11% (± 1.994) a los 100 dpi. Por el contrario, los linfocitos CD8+ mostraron una disminución significativa durante la infección crónica. En los controles sanos se observó un 30.98% (± 2.372), que disminuyó a 21.78% (± 1.265) a los 70 dpi y se mantuvo en valores similares a los 100 dpi, con 18.89% (± 1.994).

En la población de neutrófilos se observó un aumento significativo, lo que podría indicar una mielopoyesis extramedular. En los controles sanos se encontró 5.124% (± 0.5558), mientras que a los 70 dpi aumentó a 48.36% (± 1.509) y a los 100 dpi se mantuvo elevado en 37.96% (± 5.322).

Se observó una marcada disminución de la población de macrófagos con el transcurso de la infección crónica. En los controles sanos se observó un 93.47% (± 0.6172), que disminuyó drásticamente a 9.117% (± 0.5646) a los 70 dpi y a 6.256% (± 0.6653) a los 100 dpi.

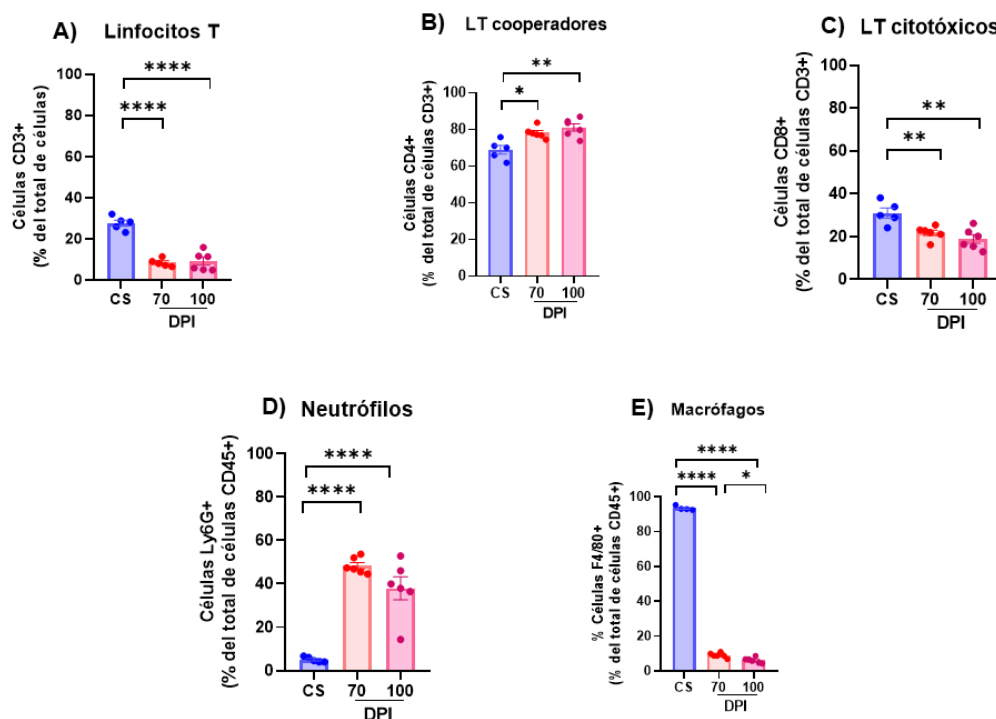


Figura 36. Inmunofenotipo de las células del bazo en el modelo experimental de actinomicetoma por *N. brasiliensis*

A) Linfocitos CD3+. B) Subpoblaciones CD4+. C) Subpoblaciones CD8+. D) Neutrófilos Ly6G+. E) Macrófagos F4/80+. Los datos corresponden a n=6 animales por grupo, provenientes de dos experimentos independientes. Para todos los análisis se realizó la prueba de ANOVA de una vía. Se muestra graficada la media $\pm$ SEM. DPI= días post infección; CS= control sano.

8.6 Cuantificación de citocinas séricas

Se analizaron los niveles séricos de diversas citocinas mediante la técnica CBA para evaluar la respuesta inmune sistémica en el modelo experimental de actinomicetoma (Figura 37. Cuantificación de citocinas séricas).

No se observaron cambios sistémicos en las citocinas asociadas a la respuesta Th1. Para IL-12p70, los valores fueron: control sano 2.078 pg/ml (0.000 – 119.7), 70 dpi 0.000 pg/ml (0.000 – 1.868) y 100 dpi 2.130 pg/ml (0.000 – 3.050), sin diferencias significativas entre grupos. En el caso de IFN- γ , se encontró: control sano 1.386 pg/ml (0.000 – 10.25), 70 dpi 1.640 pg/ml (1.430 – 1.918) y 100 dpi 1.610 pg/ml (1.118 – 1.903), sin diferencias significativas.

Para TNF- α , los valores fueron: control sano 15.46 pg/ml (12.65 – 78.37), 70 dpi 67.42 pg/ml (43.86 – 132.5) y 100 dpi 49.37 pg/ml (38.59 – 115.6), sin diferencias estadísticamente significativas.

En los niveles de IL-6, se observó un aumento a los 70 dpi (70.91 pg/ml $\pm$ 16.96) en comparación con el control sano (13.02 pg/ml $\pm$ 3.971). A los 100 dpi, los niveles fueron de 46.68 pg/ml $\pm$ 13.59, sin diferencias significativas respecto al control.

Los niveles de MCP-1 mostraron una disminución progresiva. En el control sano se encontró 125.9 pg/ml $\pm$ 21.36, mientras que a los 70 dpi fue de 74.20 pg/ml $\pm$ 15.03 y a los 100 dpi de 53.57 pg/ml $\pm$ 13.18. Este último valor fue significativamente menor en comparación con el control sano.

No se encontraron diferencias en los niveles de IL-10 entre los grupos evaluados. Los valores fueron: control sano 21.63 pg/ml $\pm$ 13.88, 70 dpi 5.493 pg/ml $\pm$ 0.6129 y 100 dpi 5.565 pg/ml $\pm$ 1.283.

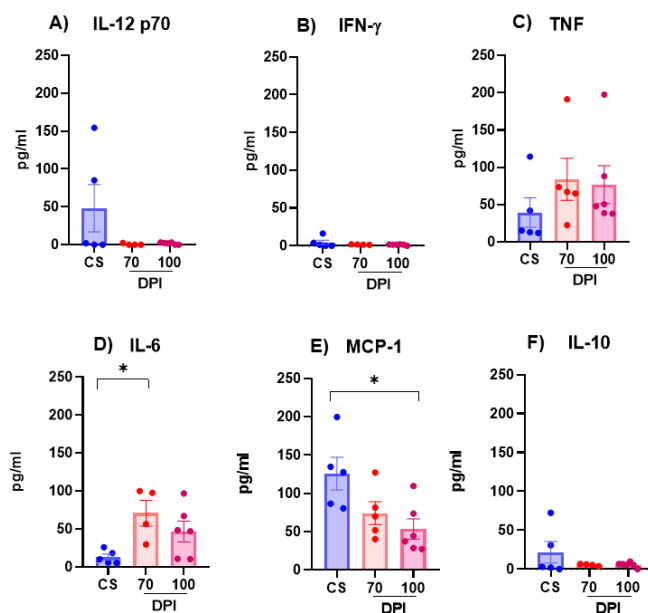


Figura 37. Cuantificación de citocinas séricas en el modelo experimental de actinomietoma por *N. brasiliensis*

A) IL-12p70, B) IFN- γ , C) TNF, D) IL-6, E) MCP-1, F) IL-10. Los datos corresponden a n=6 animales por grupo, provenientes de dos experimentos independientes. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Se muestra graficada la media $\pm$ SEM. DPI= días post infección; CS= control sano.

8.8 Expresión de PD-1 y su ligando PD-L1 en células del actinomicetoma y órganos linfoides secundarios

Se analizó la expresión de PD-1 en poblaciones linfocitarias y de su ligando PD-L1 en células mieloides. Se utilizó el valor de MFI calculado a partir del total de células en cada población analizada (análisis en *bulk*, Figura 38. Expresión de PD-1 y PD-L1 en el tejido del actinomicetoma en el modelo experimental de actinomicetoma por *N. brasiliensis*).

En el sitio de la lesión, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de las moléculas evaluadas para la mayoría de las poblaciones celulares, con una única excepción notable. La expresión de PD-1 en los linfocitos CD8⁺ aumentó de manera significativa entre los dos tiempos de la fase crónica; mientras que a los 70 dpi la MFI fue de 258.4 ± 17.72 , a los 100 dpi se elevó a 734.7 ± 143.2 . Cabe mencionar que, dado que en los tejidos sanos no se detectaron linfocitos, las comparaciones se realizaron únicamente entre los grupos infectados a 70 y 100 dpi.

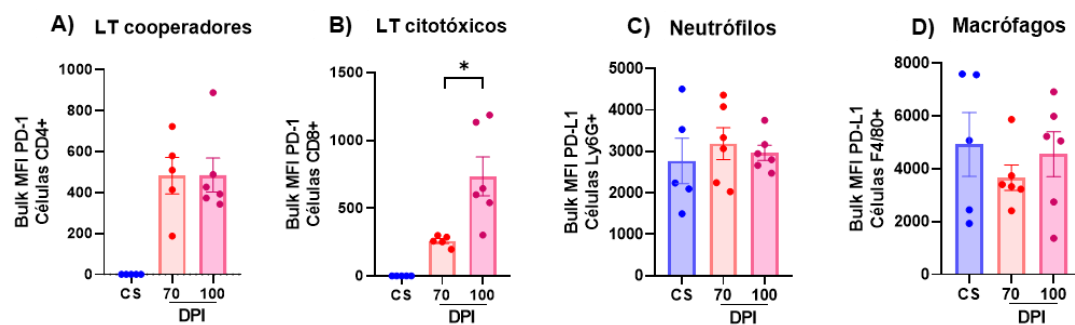


Figura 38. Expresión de PD-1 y PD-L1 en el tejido del actinomicetoma en el modelo experimental de actinomicetoma por *N. brasiliensis*

Se muestra la intensidad media de fluorescencia (MFI) para las poblaciones analizadas. A) PD-1 en linfocitos CD4⁺. B) PD-1 en linfocitos CD8⁺. C) PD-L1 en neutrófilos (Ly6G⁺). D) PD-L1 en macrófagos (F4/80⁺). Los datos corresponden a n=6 animales por grupo, provenientes de dos experimentos independientes. Dado que en tejidos

sanos no se detectaron linfocitos, la comparación se realizó únicamente entre 70 y 100 dpi mediante la prueba T de Student. Para todos los análisis se realizó la prueba de ANOVA de una vía. Se muestra graficada la media $\pm$ SEM.

En el ganglio drenante de la extremidad infectada (Figura 39. Expresión de PD-1 en el ganglio linfático poplíteo en el modelo experimental de actinomicetoma por *N. brasiliensis*), la expresión de PD-1 mostró un incremento progresivo a lo largo de la infección crónica, tanto en linfocitos CD4⁺ como en CD8⁺. En los linfocitos CD4⁺, los animales sanos presentaron una MFI de 225.0 ± 19.14 . Este valor aumentó significativamente a los 70 dpi (547.0 ± 95.50) y se mantuvo elevado, aunque con una leve disminución, a los 100 dpi (405.3 ± 79.31).

En el caso de los linfocitos CD8⁺, la expresión de PD-1 en controles sanos fue de 241.6 ± 22.13 . A diferencia de lo observado en los CD4⁺, aquí el aumento más notorio ocurrió a los 100 dpi (395.8 ± 54.54), mientras que a los 70 dpi los valores se mantuvieron similares a los del control sano (231.8 ± 18.12).

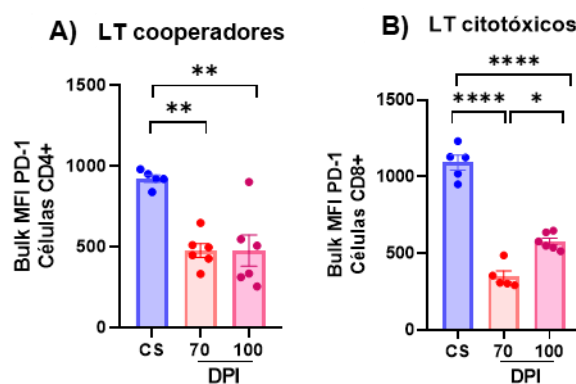


Figura 39. Expresión de PD-1 en el ganglio linfático poplíteo en el modelo experimental de actinomicetoma por *N. brasiliensis*

A) PD-1 en linfocitos CD4⁺. B) PD-1 en linfocitos CD8⁺. Los datos corresponden a n=6 animales por grupo, provenientes de dos experimentos independientes. Para todos los análisis se realizó la prueba de ANOVA de una vía. Se muestra graficada la media $\pm$ SEM.

En el bazo (Figura 40 . Expresión de PD-1 y PD-L1 en el bazo en el modelo experimental de actinomicetoma por *N. brasiliensis*), se observó un patrón diferencial según la población celular analizada. Por un lado, la expresión de PD-1 se encontró disminuida en los linfocitos T cooperadores y citotóxicos durante la infección crónica. En los linfocitos CD4+, los controles sanos mostraron una MFI de 921.2 ± 23.50 , la cual descendió a 475.7 ± 42.95 a los 70 dpi y se mantuvo en valores similares a los 100 dpi (474.8 ± 97.24). De manera análoga, en los linfocitos CD8+ la MFI pasó de 1091.0 ± 48.65 en animales sanos a 349.2 ± 36.15 a los 70 dpi y a 577.2 ± 22.36 a los 100 dpi.

Por otro lado, en las células mieloides se observó una regulación diferencial de PD-L1. En los neutrófilos (Ly6G+), la expresión de PD-L1 disminuyó significativamente durante la infección: los controles sanos presentaron una MFI de 1653.0 ± 113.7 , mientras que a los 70 dpi descendió a 698.0 ± 59.55 y a los 100 dpi se mantuvo baja (651.8 ± 82.05). En contraste, en los macrófagos (F4/80+) se observó un aumento de la expresión de PD-L1 a lo largo de la fase crónica. Los controles sanos presentaron una MFI de 1709 ± 94.01 , mientras que a los 70 dpi ascendió a 2187.0 ± 312.4 y a los 100 dpi se mantuvo al alza (3661.0 ± 475.0).

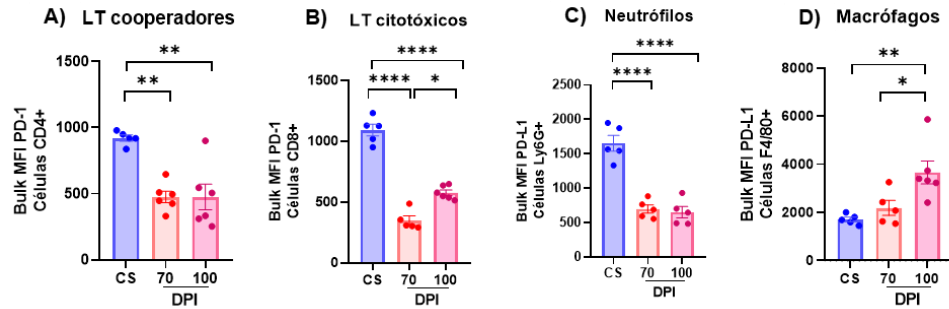


Figura 40 . Expresión de PD-1 y PD-L1 en el bazo en el modelo experimental de actinomicetoma por *N. brasiliensis*

A) PD-1 en linfocitos CD4+. B) PD-1 en linfocitos CD8+. C) PD-L1 en neutrófilos (Ly6G+). D) PD-L1 en macrófagos (F4/80+). Los datos corresponden a n=6 animales por grupo, provenientes de dos experimentos independientes. Para todos los análisis se realizó la prueba de ANOVA de una vía. Se muestra graficada la media $\pm$ SEM.

8.8.1 Comparación de la expresión de PD-1/PD-L1 entre tejidos

Con el objetivo de determinar si la regulación del eje de punto de control inmune PD-1/PD-L1 era un fenómeno restringido a un tejido específico o si, por el contrario, reflejaba un patrón sistémico, se comparó la MFI de cada población celular entre los tres tejidos analizados: actinomicetoma, ganglio linfático poplíteo y bazo.

En las cuatro poblaciones celulares evaluadas se observó una tendencia consistente hacia el aumento de la expresión de este eje en el tejido infectado, en comparación con los órganos linfoides secundarios (Figura 41. Expresión de PD-1/PD-L1 en actinomicetoma, ganglio y bazo. Esta tendencia fue particularmente evidente en los neutrófilos provenientes del sitio de la lesión, donde la expresión de PD-L1 alcanzó los valores más elevados en comparación con los neutrófilos del ganglio y del bazo.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que la regulación del eje PD-1/PD-L1 no solo ocurre de manera diferencial según la población celular y el tiempo de infección, sino que también presenta un patrón de expresión más acentuado en el microambiente local del actinomicetoma, particularmente en la población neutrofílica, en comparación con los órganos linfoides secundarios.

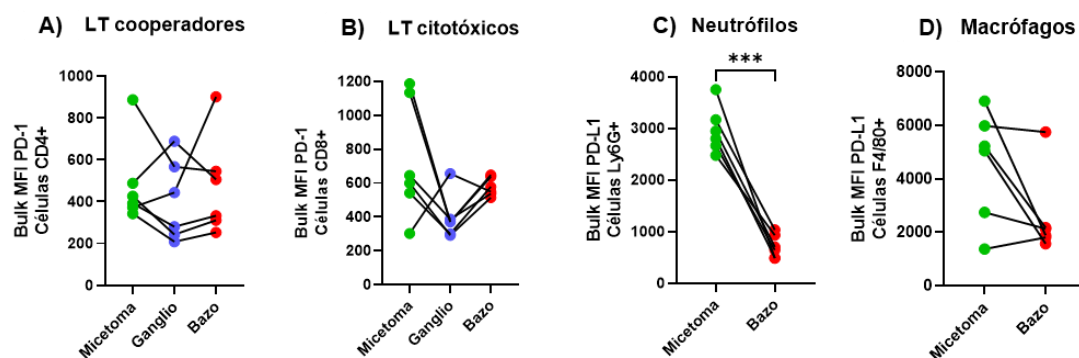


Figura 41. Expresión de PD-1/PD-L1 en actinomicetoma, ganglio y bazo

Se observó una tendencia al aumento del eje en el tejido infectado para las cuatro poblaciones analizadas, A) PD-1 en linfocitos CD4+. B) PD-1 en linfocitos CD8+. C) PD-L1 en neutrófilos (Ly6G+). D) PD-L1 en macrófagos (F4/80+), siendo significativa para los neutrófilos del micetoma (prueba T pareada). Datos como media $\pm$ SEM (n=6 animales por grupo, dos experimentos independientes).

8.9 Esquema de administración del anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 humanizado y evaluación clínica de la respuesta

Con base en nuestros hallazgos previos que demostraron el establecimiento de la sobreexpresión del eje PD-1/PD-L1 durante la infección crónica por *N. brasiliensis*, se procedió a evaluar el efecto terapéutico de su bloqueo.

Ratones con actinomicetoma por *N. brasiliensis* a las 10 semanas post infección (spi) fueron tratados con inyecciones intraperitoneales semanales de anti-PD-L1 (atezolizumab) o con vehículo como control durante cuatro semanas, junto con controles no infectados pareados por edad (Figura 42. Cronograma experimental para la administración de anti-PD-L1 humanizado en ratones BALB/c infectados crónicamente con *N. brasiliensis*).

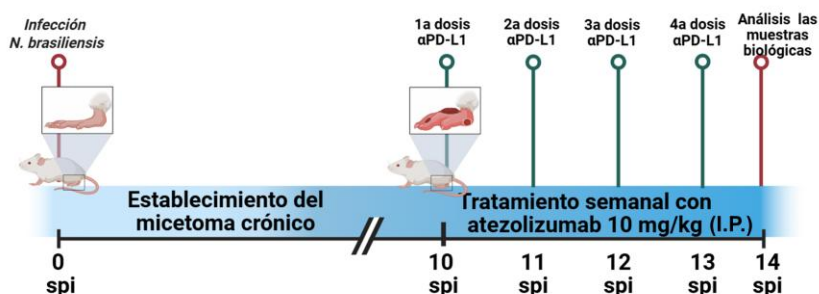


Figura 42. Cronograma experimental para la administración de anti-PD-L1 humanizado en ratones BALB/c infectados crónicamente con *N. brasiliensis*
Spi= semanas post infección; I.P.= vía intraperitoneal.

La administración de atezolizumab se asoció con una mortalidad significativa e inesperada. Como consecuencia, las tasas de supervivencia descendieron al 84.6% después de la segunda dosis, al 46.2% tras la tercera dosis, y disminuyeron aún más al 38.5% al finalizar el protocolo de tratamiento, quedando solo 5 animales disponibles

para el análisis (Figura 43. Curvas de supervivencia durante el tratamiento con atezolizumab). Esta tasa de mortalidad fue significativa en comparación con los grupos control infectados tratados con vehículo y los controles no infectados, en los que no hubo muertes.

En los grupos de animales sanos que se administró el mismo esquema de tratamiento, no se observó mortalidad a través del tiempo.

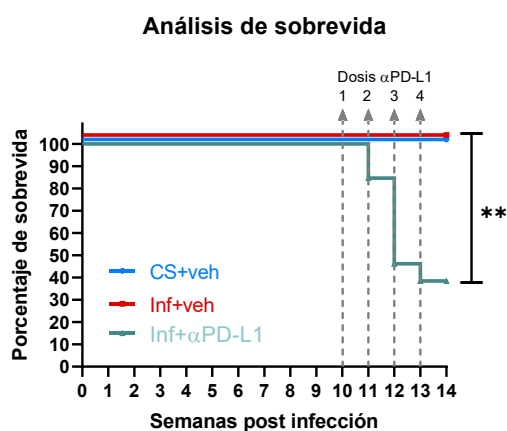


Figura 43. Curvas de supervivencia durante el tratamiento con atezolizumab
Comparación de controles no infectados tratados con vehículo (n=6), infectados tratados con vehículo (n=6) e infectados tratados con anti-PD-L1 (n=13). Prueba de Log-rank (Mantel-Cox). CS= control sano; veh= vehículo; Inf= Infección.

La evaluación del volumen de la lesión por actinomicetoma en el cojinete plantar no reveló ningún beneficio terapéutico significativo con el uso del anticuerpo monoclonal (Figura 44. Evolución del actinomicetoma con la administración del anticuerpo anti-PD-L1 A). El monitoreo semanal del cambio en el volumen de la lesión, normalizado al inicio del tratamiento (0 spi), mostró que no hubo diferencias significativas en la progresión de la lesión durante las cuatro semanas, entre el grupo tratado con anti-PD-

L1, el grupo vehículo y los controles (Figura 44. Evolución del actinomicetoma con la administración del anticuerpo anti-PD-L1 B y C). Esto demuestra que la inhibición de PD-L1 no mejoró ni aceleró la inflamación macroscópica asociada al actinomicetoma crónico, disociando el desenlace fatal de los cambios macroscópicos en el tamaño de la lesión.

Debido a la mortalidad observada, se decidió reorganizar el análisis en cuatro grupos experimentales: 1) control sin infección; 2) control de infección sin tratamiento, que solo recibió el vehículo; 3) animales que recibieron solo una dosis de anti-PD-L1; y 4) animales que sí sobrevivieron al protocolo completo de tratamiento de 4 dosis.

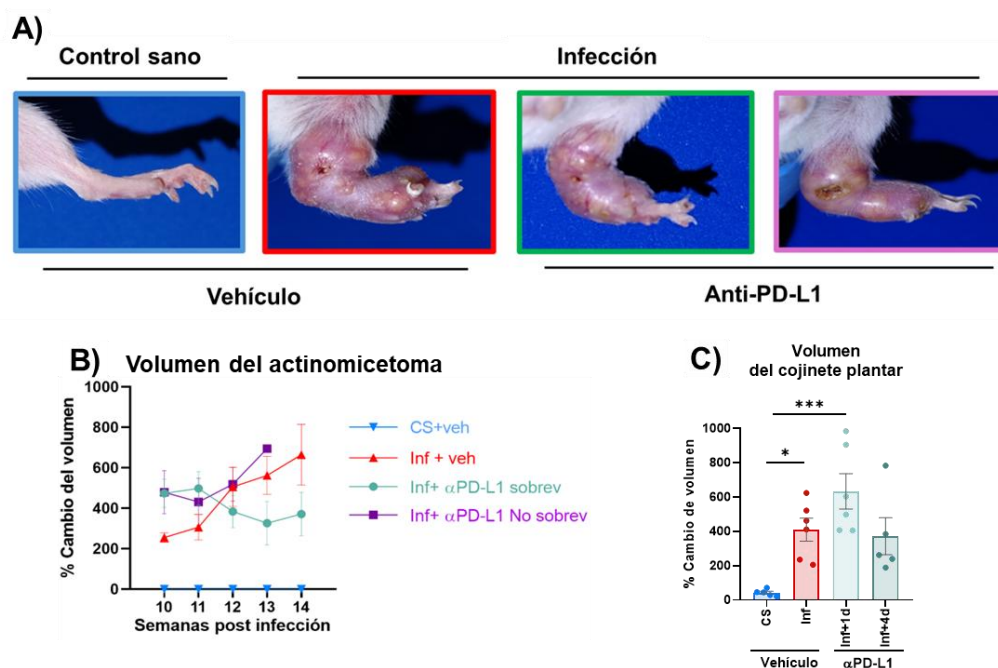


Figura 44. Evolución del actinomicetoma con la administración del anticuerpo anti-PD-L1

A) Fotografías macroscópicas representativas de las patas traseras de los grupos: de izquierda a derecha, control no infectado tratado con vehículo, infectado tratado con vehículo e infectado tratado con anti-PD-L1 (sobrevivientes y no sobrevivientes). B) Evaluación longitudinal del cambio en el volumen de la lesión en grupos infectados tratados con vehículo (n=6) y anti-PD-L1 (sobrevivientes n=5; no sobrevivientes n=8),

así como C) la comparación estadística en el punto final del experimento. Datos como media $\pm$ SEM de dos experimentos independientes. ANOVA de una vía con Tukey.

Asimismo, los pesos de los órganos se pesaron al final del experimento (Figura 45. Peso de los tejidos al final del tratamiento). El peso de las lesiones por actinomicetoma y los órganos en los grupos tratados no difirió estadísticamente del de los controles infectados. En contraste, el bazo y el ganglio linfático drenante mostraron una hipertrofia significativa en todos los grupos infectados en comparación con los animales no infectados, sin cambios tras el tratamiento con anti-PD-L1.

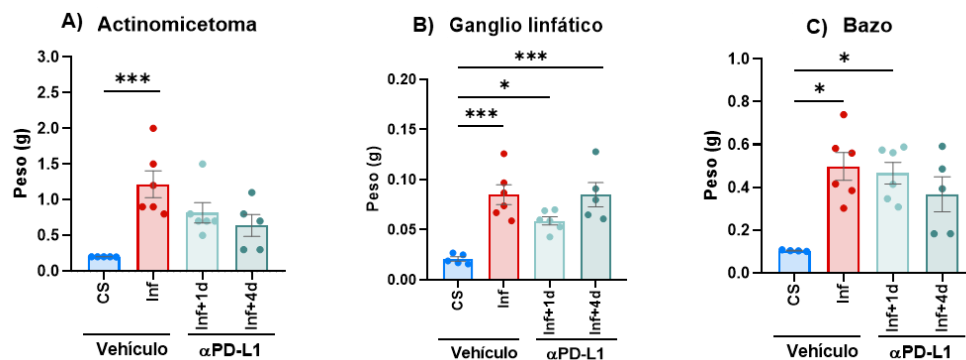


Figura 45. Peso de los tejidos al final del tratamiento

Los gráficos de barras muestran la masa (g) del A) tejido plantar lesionado, B) el ganglio linfático poplíteo drenante y C) el bazo para cada grupo experimental. Los datos fueron agrupados a partir de dos experimentos independientes: control no infectado tratado con vehículo (n=6), infectado tratado con vehículo (n=6), infectado tratado con una dosis de anti-PD-L1 (n=6) e infectado tratado con cuatro dosis de anti-PD-L1 (n=5). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

8.10 Cuantificación de la carga bacteriana ante el tratamiento con anti-PD-L1

Se cuantificó la carga bacteriana de *N. brasiliensis* en las lesiones de los animales sobrevivientes al término del experimento. Los ratones que completaron el esquema de cuatro dosis de atezolizumab presentaron una carga bacteriana significativamente superior en comparación tanto con los controles infectados que recibieron únicamente el vehículo como con aquellos tratados con una sola dosis del anticuerpo.

Como era esperable, en los tejidos de los animales sanos no se detectaron unidades formadoras de colonia. En los grupos infectados, se obtuvieron los siguientes valores: los ratones tratados con vehículo mostraron una carga de 1458 UFC/g de tejido (1458 – 2170); el grupo que recibió una sola dosis presentó 3290 UFC/g (100 – 12100); mientras que el grupo tratado con cuatro dosis alcanzó 133000 UFC/g (91850 – 192000) (Figura 46. Carga bacteriana de *N. brasiliensis* en las lesiones de ratones sobrevivientes).

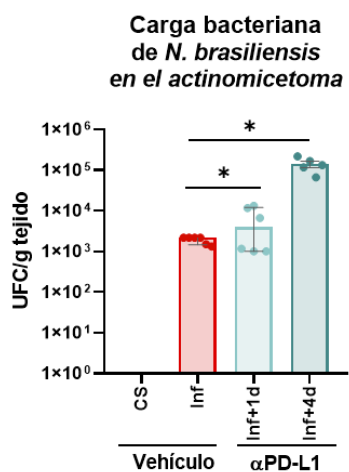


Figura 46. Carga bacteriana de *N. brasiliensis* en las lesiones de ratones sobrevivientes

Los ratones que recibieron el régimen completo de cuatro dosis de atezolizumab presentaron una carga bacteriana significativamente mayor. Los datos fueron agrupados a partir de dos experimentos independientes: control no infectado tratado con vehículo (n=6), infectado tratado con vehículo (n=6), infectado tratado con una dosis de anti-PD-L1 (n=6) e infectado tratado con cuatro dosis de anti-PD-L1 (n=5). Kruskal-Wallis. Datos como media $\pm$ SEM.

8.11 Evaluación histopatológica de la lesión como respuesta al bloqueo de PD-L1 con un anticuerpo monoclonal

Con el objetivo de evaluar el impacto del punto de control inmunitario PD-1/PD-L1 en el desarrollo de la inmunopatología local, se realizó un análisis comparativo entre las lesiones de los ratones infectados con *N. brasiliensis* sin tratamiento y aquellos sometidos al bloqueo terapéutico con el anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 (Figura 47. Exacerbación inmunopatológica y destrucción tisular masiva tras el bloqueo del eje PD-L1 en el actinomicetoma experimental).

En los especímenes del grupo control, la respuesta inmune local presentó una arquitectura granulomatosa e inflamatoria focalizada, caracterizada por la formación de un microabsceso bien delimitado que confina de manera eficiente al grano bacteriano central. El infiltrado leucocitario perilesional se presentó de forma concéntrica y organizada, limitando la extensión del daño hacia el estroma circundante y preservando en gran medida la integridad de los haces de colágeno dérmicos y la hipodermis.

En contraste, el bloqueo del eje inhibitorio mediante el tratamiento anti-PD-L1 indujo una alteración de la respuesta tisular, lo que se correlacionó con las menores tasas de sobrevida y el daño macroscópico observado en este grupo.

Histológicamente, se evidenció una pérdida total de la compartimentalización de la infección, manifestada por la confluencia de extensas áreas supurativas y la formación de un absceso masivo hipercelular. En el núcleo de esta lesión inflamatoria, se observó un aumento notable en el tamaño y el número de los granos bacterianos, que estaban rodeados por densas masas de PMN.

Asimismo, la periferia de la lesión reveló una destrucción pantisular severa, con lisis generalizada de la matriz extracelular dérmica y de los anexos cutáneos, y un compromiso destructivo profundo que abarcó las estructuras óseas y cartilaginosas subyacentes.

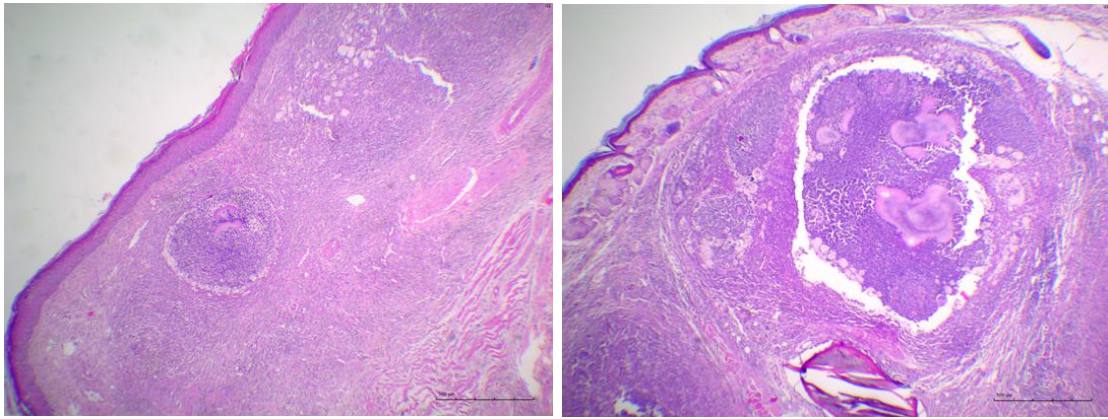


Figura 47. Exacerbación inmunopatológica y destrucción tisular masiva tras el bloqueo del eje PD-L1 en el actinomicetoma experimental

Tinción H&E 4X. Microfotografías comparativas de (Izq) un individuo sin tratamiento y (Der) de un espécimen tratado con anticuerpo monoclonal anti-PD-L1. Barra de escala: 500 μ m.

De forma semicuantitativa, el examen histopatológico de las secciones provenientes de los animales que fallecieron durante el tratamiento con anti-PD-L1 reveló una respuesta inflamatoria local significativamente exacerbada en comparación con los controles infectados tratados únicamente con vehículo.

Específicamente, se observó un marcado aumento en la proliferación de fibroblastos, así como necrosis y paniculitis más extensas. En contraste, no se encontraron diferencias significativas en las puntuaciones de otros infiltrados celulares ni en los hallazgos patológicos (Figura 48. Evaluación histopatológica de los animales al final del tratamiento con anti-PD-L1).

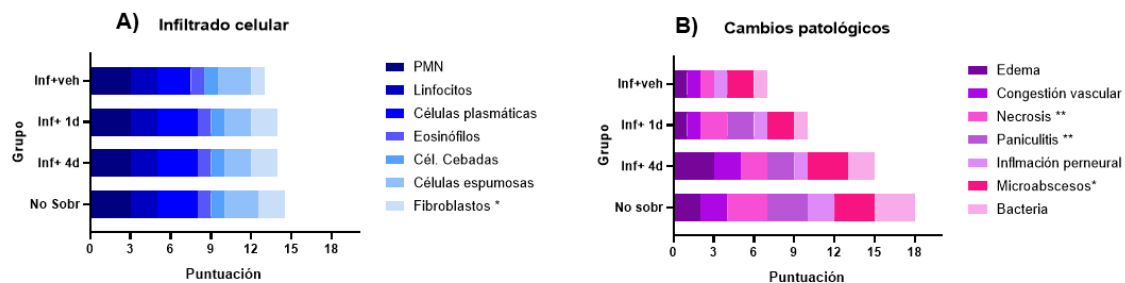


Figura 48. Evaluación histopatológica de los animales al final del tratamiento con anti-PD-L1

A) Evaluación del infiltrado celular y B) cambios patológicos de la lesión. Datos como mediana e IQR (n=6 por grupo para controles sanos, infectados + vehículo, 1 dosis y 4 dosis; n=4 para no sobrevivientes; dos experimentos independientes). Kruskal-Wallis con post-hoc de Dunn.

8.12 Análisis morfométrico del grano asociado al bloqueo del eje PD-L1

Con la finalidad de esclarecer el impacto funcional del punto de control inmunitario PD-1/PD-L1 en la morfología y progresión de las colonias bacterianas *in vivo*, se

realizó un análisis morfométrico comparativo digital enfocado en cuantificar los cambios en el área, el perímetro y el índice de circularidad de los granos de *N. brasiliensis* (Figura 49. Análisis histopatológico comparativo y remodelación morfométrica del grano actinomicótico bajo el bloqueo del eje PD-L1).

El escrutinio histopatológico demostró que el bloqueo terapéutico con el anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 altera drásticamente la capacidad de contención del hospedero, induciendo una remodelación tisular y una expansión bacteriana que se correlacionan de manera directa con las menores tasas de supervivencia del modelo.

En los animales del grupo control (infectado + vehículo) y en las fases iniciales de inmunomodulación (1 y 4 dosis de anti-PD-L1), los granos bacterianos retuvieron una configuración compacta, con contornos lobulados.

No obstante, en el grupo de animales fenotípicamente más graves, los cuales no sobrevivieron al tratamiento inmunomodulador, se constató un viraje morfométrico radical en la arquitectura del grano bacteriano.

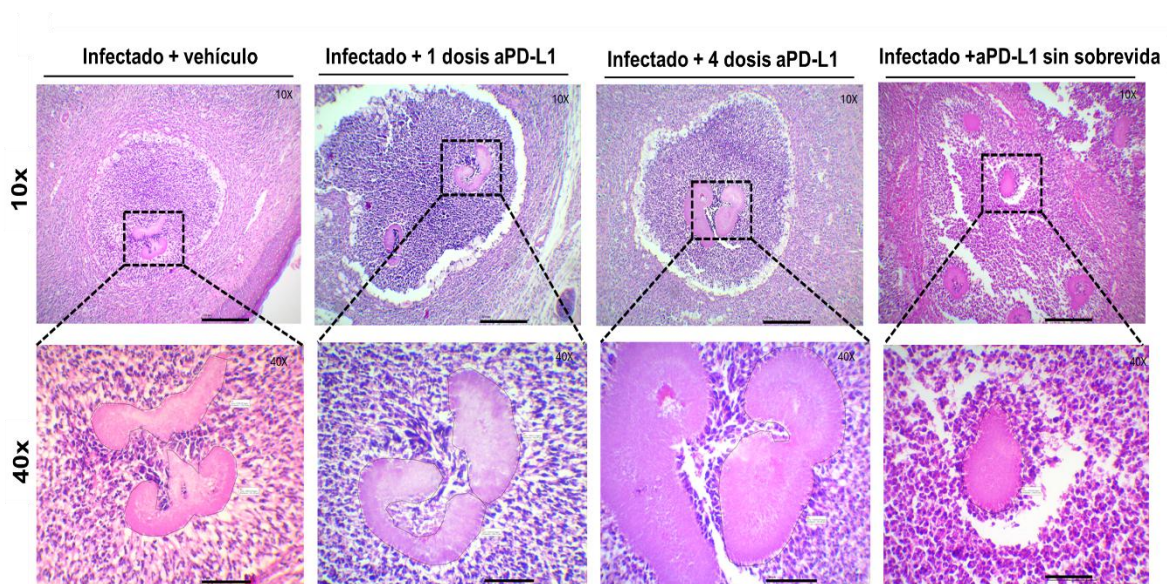


Figura 49. Análisis histopatológico comparativo y remodelación morfométrica del grano actinomicótico bajo el bloqueo del eje PD-L1

Tinción con H&E (10X y 40X). Secuencia de microfotografías representativas que ilustran las modificaciones estructurales en los granos de *N. brasiliensis* en función de la dosificación y la sobrevida de los animales. Barras de escala: 10X = 200 μm ; 40X = 50 μm .

El análisis cuantitativo (Figura 50. Análisis morfométrico de los granos de *N. brasiliensis* en los grupos tratados con anti-PD-L1) reveló que los granos bacterianos de los especímenes sin sobrevida experimentaron un incremento estadísticamente significativo en comparación con el perímetro y área basales, con 377.5 μm (285.5 – 473.0) y 7117 μm^2 (4448.0 – 11308), respectivamente.

Paralelamente, este grupo evidenció un aumento máximo en el índice de circularidad con 0.8040 (0.6322 – 0.8693), lo que significó una morfología circular regular en comparación con los grupos control.

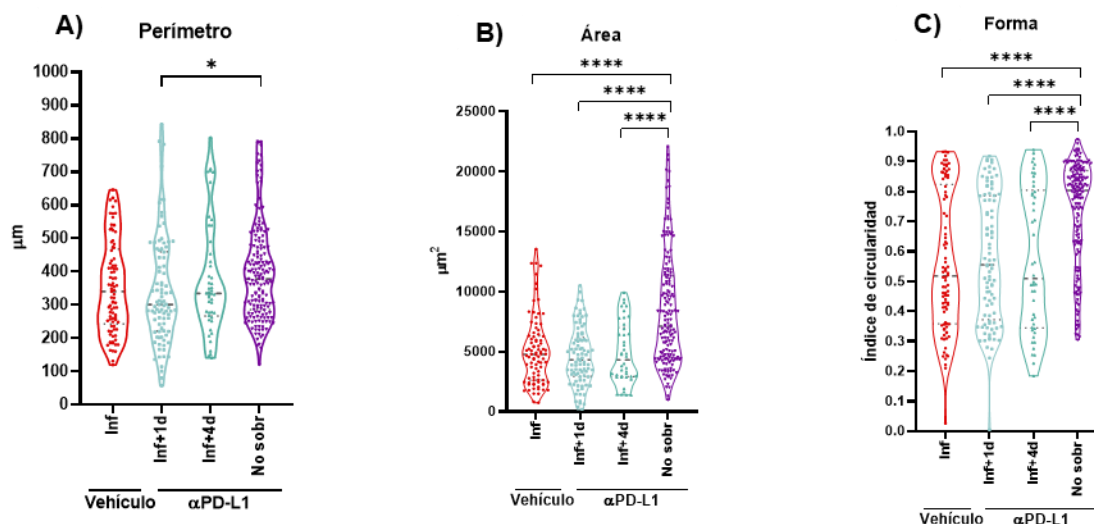


Figura 50. Análisis morfométrico de los granos de *N. brasiliensis* en los grupos tratados con anti-PD-L1

Análisis morfométrico cuantitativo de los granos de *N. brasiliensis*, incluyendo (A) perímetro, (B) área y (C) índice de circularidad. Se analizó un total de 395 granos individuales distribuidos en las siguientes cohortes: infectado tratado con vehículo (n = 6 ratones, 89 granos), infectado tratado con una dosis de anti-PD-L1 (n = 6 ratones, 90 granos), infectado tratado con cuatro dosis de anti-PD-L1 sobrevivientes (n = 5 ratones, 46 granos) e infectado tratado con anti-PD-L1 no sobrevivientes (n = 6 ratones, 170 granos). Los datos fueron agrupados a partir de dos experimentos independientes y se presentan como mediana con IQR. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

8.13 Análisis del inmunofenotipo de la lesión por micetoma y órganos linfoides secundarios tras el bloqueo de PD-L1

El inmunofenotipo de la lesión por actinomietoma analizado por citometría de flujo (Figura 51. Inmunofenotipo del actinomietoma en los grupos tratados con anti-PD-L1 reveló un infiltrado limitado de linfocitos T (aproximadamente el 1% del total de células) en todos los grupos infectados, independientemente del tratamiento.

Una sola dosis de anti-PD-L1 aumentó transitoriamente la proporción de linfocitos CD4+ a 83.28% (± 1.287), y disminuyó la de linfocitos CD8+ a 16.72% (± 1.287) en

comparación con los controles infectados, un efecto que no se mantuvo después de cuatro dosis.

El compartimento mieloide de la lesión estuvo dominado por neutrófilos (cerca del 95% de los leucocitos) en todos los grupos infectados, con una reducción concomitante de macrófagos; este panorama no se modificó con el tratamiento.

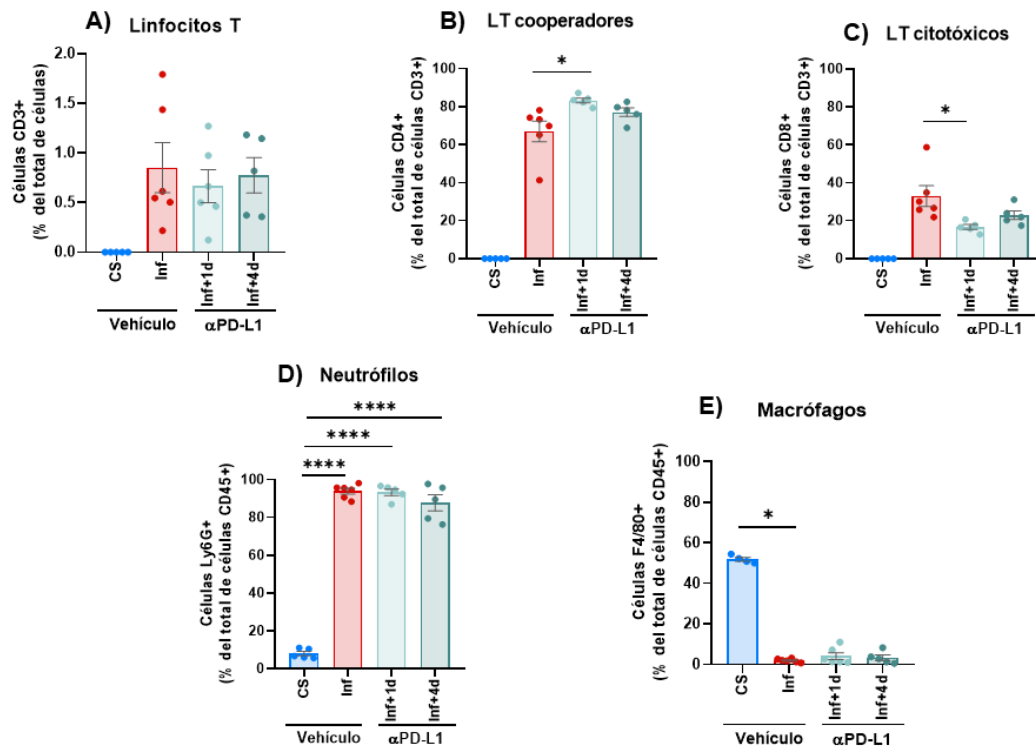


Figura 51. Inmunofenotipo del actinomictoma en los grupos tratados con anti-PD-L1

(A-C) Análisis por citometría de flujo del compartimento linfoide en la lesión por mictoma: frecuencias de (A) linfocitos CD3+, (B) linfocitos CD4+ y (C) linfocitos CD8+. (D-E) Análisis del compartimento mieloide de la lesión: frecuencias de (D) neutrófilos Ly6G+ y (E) macrófagos F4/80+. Los datos corresponden a n=6 animales por grupo para controles sanos, infectados + vehículo y 1 dosis; n=5 para 4 dosis; provenientes de dos experimentos independientes. Para todos los análisis, se realizó la prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se muestra graficada la media $\pm$ SEM.

El análisis de los órganos linfoides secundarios mostró patrones distintos. En el ganglio linfático poplíteo drenante (Figura 52. Inmunofenotipo del ganglio linfático poplíteo en los grupos tratados con anti-PD-L1), la frecuencia de linfocitos totales no se modificó con respecto al control de infección tratado con el vehículo, tanto en el régimen de una sola dosis como en el de cuatro dosis.

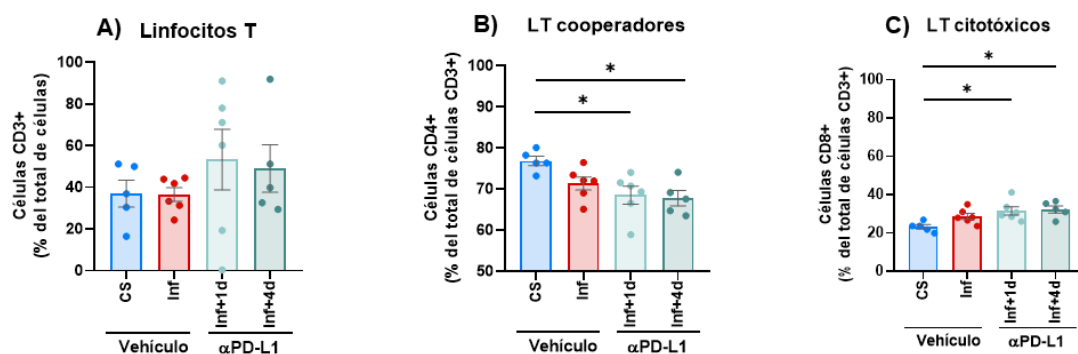


Figura 52. Inmunofenotipo del ganglio linfático poplíteo en los grupos tratados con anti-PD-L1

(A-C) Análisis por citometría de flujo del compartimento linfoide en la lesión por micetoma: frecuencias de (A) linfocitos CD3+, (B) linfocitos CD4+ y (C) linfocitos CD8+. Los datos corresponden a n=6 animales por grupo para controles sanos, infectados + vehículo y 1 dosis; n=5 para 4 dosis; provenientes de dos experimentos independientes. Para todos los análisis se realizó la prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se muestra graficada la media $\pm$ SEM.

En el bazo, el tratamiento durante la infección no provocó cambios en las poblaciones linfoides (Figura 53. Inmunofenotipo del bazo en los grupos tratados con anti-PD-L1). Las poblaciones mieloides esplénicas reflejaron lo observado en la lesión, con una expansión de neutrófilos y una disminución de macrófagos en todos los grupos infectados, sin cambios con el tratamiento.

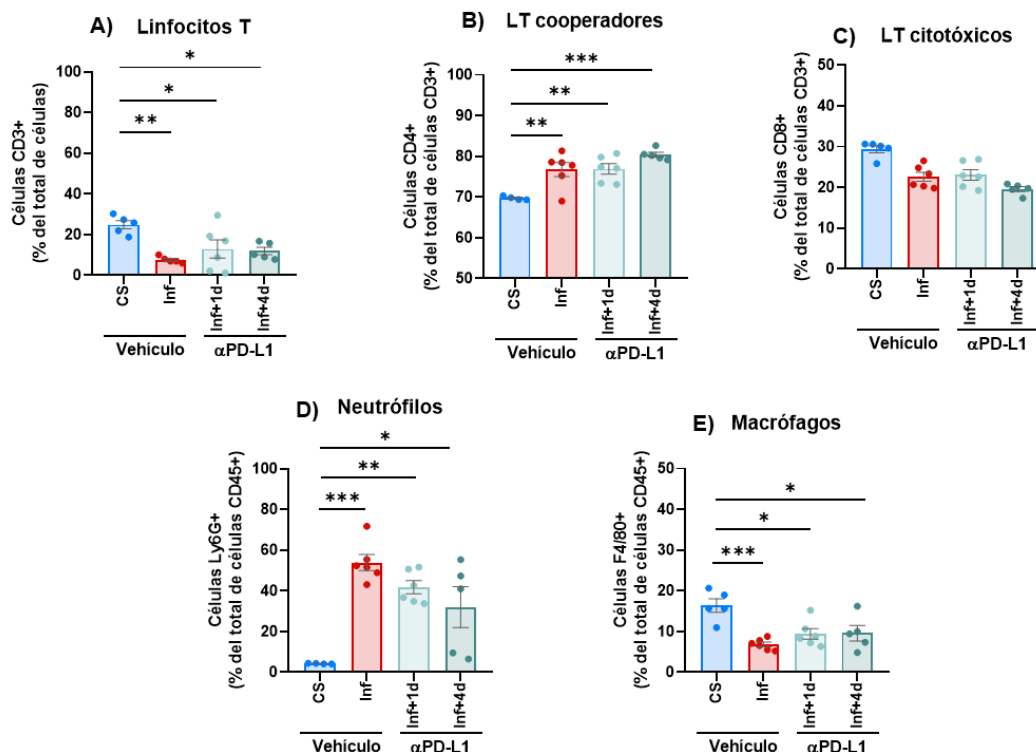


Figura 53. Inmunofenotipo del bazo en los grupos tratados con anti-PD-L1
 (A-C) Análisis por citometría de flujo del compartimento linfoide en la lesión por micetoma: frecuencias de (A) linfocitos CD3+, (B) linfocitos CD4+ y (C) linfocitos CD8+. (D-E) Análisis del compartimento mieloide de la lesión: frecuencias de (D) neutrófilos Ly6G+ y (E) macrófagos F4/80+. Los datos corresponden a n=6 animales por grupo para controles sanos, infectados + vehículo y 1 dosis; n=5 para 4 dosis; provenientes de dos experimentos independientes. Para todos los análisis se realizó la prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se muestra graficada la media $\pm$ SEM.

8.14 Perfil de citocinas séricas tras el bloqueo de PD-L1

El análisis de las citocinas séricas (Figura 54. Perfil de citocinas séricas tras el bloqueo de PD-L1 en el modelo experimental de actinomicetoma por *N. brasiliensis*) reveló que el régimen de cuatro dosis de atezolizumab desencadenó una elevación sérica dual de la citocina polarizadora Th1 IL-12p70 a 4.365 pg/ml ($\pm$ 1.338) y la citocina inmunorreguladora IL-10 a 13.62 pg/ml ($\pm$ 3.466), lo que sugiere una paradoja a la

inducción simultánea de la activación y la supresión a nivel sistémico, en comparación con los controles sanos.

Si bien la infección por *N. brasiliensis* elevó de forma natural los niveles sistémicos de IL-6, la inhibición sostenida de PD-L1 atenuó significativamente esta respuesta, con un valor de 27.74 pg/ml (± 9.649). Además, el bloqueo no modificó los niveles de TNF- α o IFN- γ , ni revirtió la disminución de MCP-1 asociada a la infección.

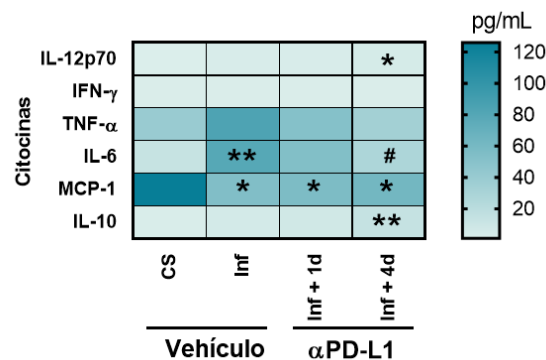


Figura 54. Perfil de citocinas séricas tras el bloqueo de PD-L1 en el modelo experimental de actinomicetoma por *N. brasiliensis*

El mapa de calor representa las concentraciones de citocinas séricas a partir de muestras de sangre cardíaca. Grupos: control no infectado tratado con vehículo (n=6), infectado tratado con vehículo (n=6), infectado tratado con una dosis de anti-PD-L1 (1d; n=6) e infectado tratado con cuatro dosis de anti-PD-L1 (4d; n=5). Los datos fueron agrupados a partir de dos experimentos independientes. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. * vs. control no infectado tratado con vehículo; # vs. control infectado tratado con vehículo.

8.15 Análisis de la expresión del eje PD-1/PD-L1 compartimento-específica en el modelo de actinomicetoma experimental.

Se cuantificó la expresión de PD-1 y PD-L1 en distintos tejidos tras el tratamiento con atezolizumab. El microambiente de la lesión por actinomicetoma resultó refractario a

la modulación del punto de control. No se observaron cambios significativos en el recuento absoluto ni en la MFI de los linfocitos T CD4+ o CD8+ PD-1+, ni en el recuento absoluto ni en la MFI de PD-L1 en neutrófilos Ly6G+ o macrófagos F4/80+ en ninguno de los grupos tratados (Figura 55. Dinámica de expresión de PD-1 y PD-L1 en el actinomicetoma como efecto del bloqueo de PD-L1).

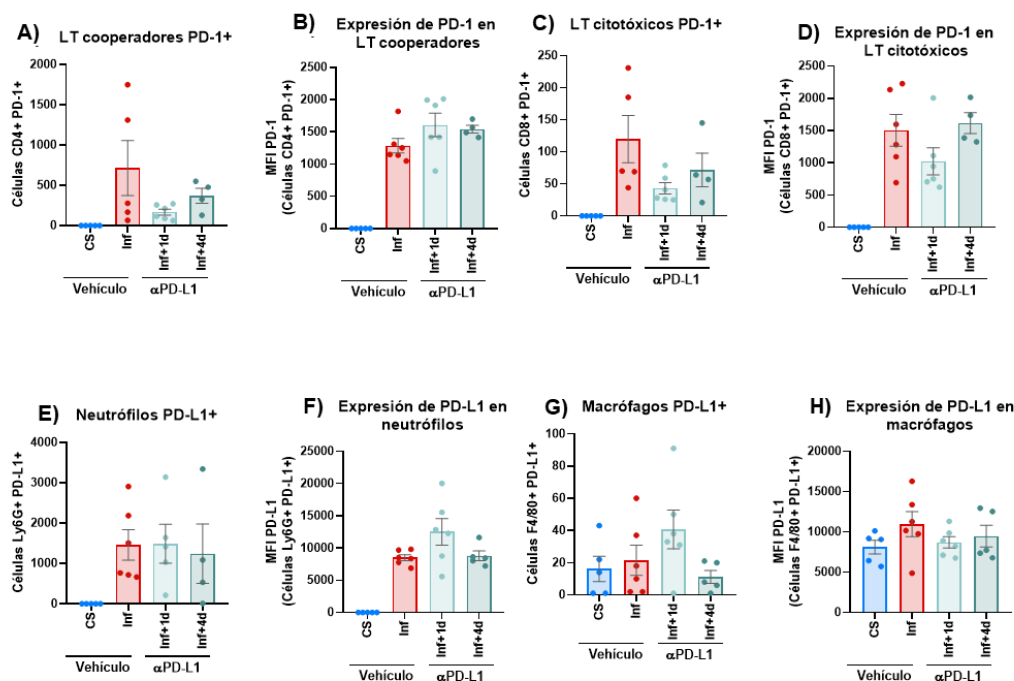


Figura 55. Dinámica de expresión de PD-1 y PD-L1 en el actinomicetoma como efecto del bloqueo de PD-L1

Análisis del compartimento de linfocitos CD4+: (A) recuento absoluto y (B) intensidad media de fluorescencia (MFI) de PD-1. Análisis del compartimento de linfocitos CD8+: (C) recuento absoluto y (D) MFI de PD-1. Análisis del compartimento de neutrófilos (Ly6G+): (E) recuento absoluto y (F) MFI de PD-L1. Análisis del compartimento de macrófagos (F4/80+): (G) recuento absoluto y (H) MFI de PD-L1. Los datos corresponden a n=6 animales por grupo para control no infectado + vehículo, infectado + vehículo e infectado + 1 dosis de anti-PD-L1; n=5 para infectado + 4 dosis de anti-PD-L1; provenientes de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

En contraste, se detectaron cambios dinámicos en los órganos sistémicos. El análisis del ganglio linfático poplíteo drenante reveló un patrón distinto. El recuento absoluto de linfocitos T CD4+ PD-1+ se encontró elevado en los grupos infectados y en el grupo de cuatro dosis, en comparación con los controles no infectados. En cuanto a los linfocitos CD8+, la infección aumentó el recuento absoluto de células PD-1+, el cual fue suprimido transitoriamente por una sola dosis antes de regresar a los niveles del control infectado después de cuatro dosis (Figura 56. Dinámica de expresión de PD-1 y PD-L1 en el ganglio linfático poplíteo como efecto del bloqueo de PD-L1).

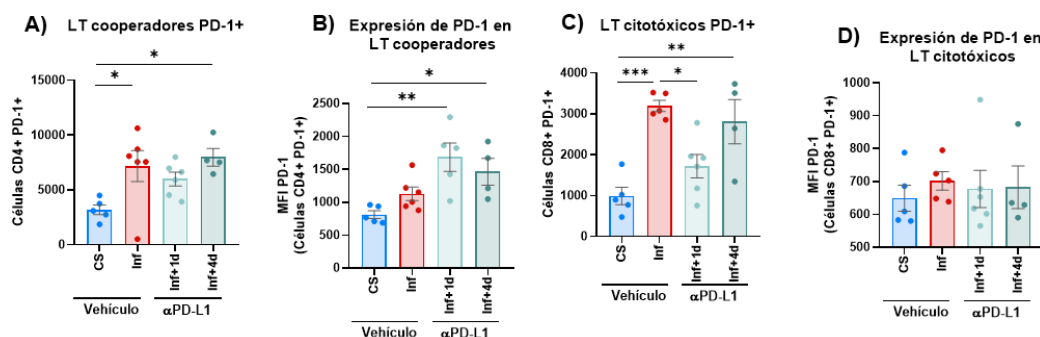


Figura 56. Dinámica de expresión de PD-1 y PD-L1 en el ganglio linfático poplíteo como efecto del bloqueo de PD-L1

Análisis del compartimento de linfocitos CD4+: (A) recuento absoluto y (B) intensidad media de fluorescencia (MFI) de PD-1. Análisis del compartimento de linfocitos CD8+: (C) recuento absoluto y (D) MFI de PD-1. Los datos corresponden a n=6 animales por grupo para control no infectado + vehículo, infectado + vehículo e infectado + 1 dosis de anti-PD-L1; n=5 para infectado + 4 dosis de anti-PD-L1; provenientes de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

En el bazo, el recuento absoluto de linfocitos T CD4+ PD-1+ disminuyó en ambos grupos tratados. En el caso de los linfocitos CD8+, las células PD-1+ disminuyeron únicamente tras una sola dosis. Sin embargo, la MFI de PD-1 en los linfocitos CD4+ aumentó marcadamente después de cuatro dosis. La expresión esplénica de PD-L1 en células mieloides también fue modulada: la MFI de PD-L1 en células Ly6G+ y F4/80+ aumentó transitoriamente tras una sola dosis, mientras que el recuento absoluto de neutrófilos Ly6G+ PD-L1+ se elevó después del tratamiento sostenido (Figura 57. Dinámica de expresión de PD-1 y PD-L1 en el bazo como efecto del bloqueo de PD-L1).

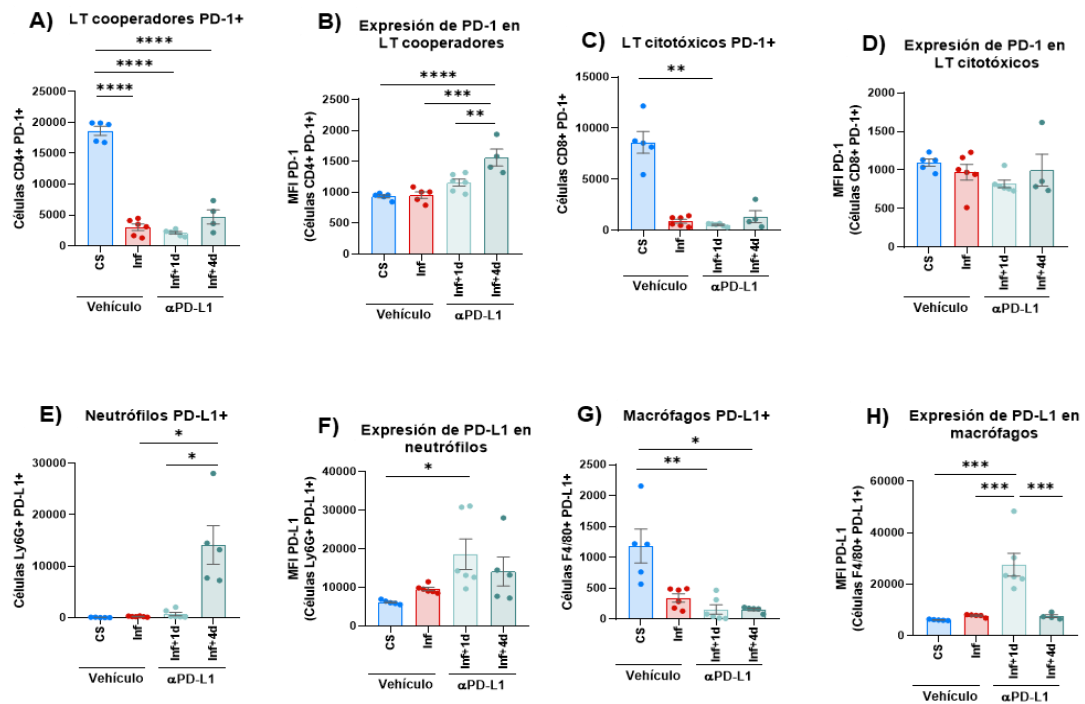


Figura 57. Dinámica de expresión de PD-1 y PD-L1 en el bazo como efecto del bloqueo de PD-L1

Análisis del compartimento de linfocitos CD4+: (A) recuento absoluto y (B) intensidad media de fluorescencia (MFI) de PD-1. Análisis del compartimento de linfocitos CD8+: (C) recuento absoluto y (D) MFI de PD-1. Análisis del compartimento de neutrófilos (Ly6G+): (E) recuento absoluto y (F) MFI de PD-L1. Análisis del

compartimento de macrófagos (F4/80+): (G) recuento absoluto y (H) MFI de PD-L1. Los datos corresponden a n=6 animales por grupo para control no infectado + vehículo, infectado + vehículo e infectado + 1 dosis de anti-PD-L1; n=5 para infectado + 4 dosis de anti-PD-L1; provenientes de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

8.16 Evaluación de la proliferación de esplenocitos en presencia de anti-PD-L1

Para determinar el papel de la vía PD-1/PD-L1 en la capacidad replicativa de las células mononucleares esplénicas, se evaluó la proliferación celular inducida por el mitógeno concanavalina A mediante la dilución del colorante vital CFSE, calculando el índice de estimulación en presencia o ausencia de atezolizumab (Figura 58. Proliferación de esplenocitos en presencia de anti-PD-L1). Los resultados revelaron un comportamiento diferencial entre ambos grupos experimentales frente al bloqueo del punto de control inmunitario.

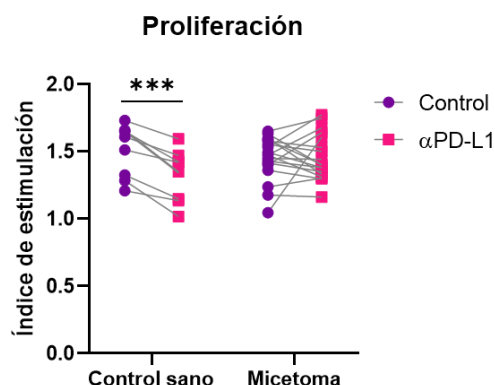


Figura 58. Proliferación de esplenocitos en presencia de anti-PD-L1

Células de ratones sanos y con micetoma crónico (100 dpi) fueron marcadas con CFSE, estimuladas con ConA y tratadas o no con atezolizumab por 72 horas. Datos como media $\pm$ SEM (n=3-6, dos experimentos independientes). t Student pareada.

En los animales del grupo control sano, las células mononucleares mostraron una disminución estadísticamente significativa del índice de estimulación tras la adición de anti-PD-L1, en comparación con su respectivo control basal estimulado.

Por el contrario, en el grupo de ratones con actinomicetoma (100 dpi), el bloqueo *in vitro* de PD-L1 no indujo una respuesta homogénea de inhibición; en su lugar, se observó una marcada heterogeneidad celular entre las réplicas biológicas, en la que una fracción importante de los animales experimentó un incremento en su capacidad proliferativa y otros se mantuvieron constantes, lo que impidió establecer diferencias estadísticas globales entre la condición control y el tratamiento.

8.17 Medición de la adhesión de PMN esplénicos tras el bloqueo de PD-L1 en presencia de *N. brasiliensis* inactivada por calor

Para evaluar el impacto de la vía de señalización de PD-L1 en la funcionalidad celular durante la infección crónica, se determinó la capacidad de adhesión de células esplénicas de ratones infectados con *N. brasiliensis* (100 dpi) y de controles sanos mediante un ensayo en cámara de Boyden modificada.

El análisis histológico cualitativo de los filtros de nitrocelulosa teñidos con H&E (Figura 59. El bloqueo de PD-L1 revierte la hiperadhesión celular inducida por *N. brasiliensis* en esplenocitos de ratón con actinomicetoma), confirmó los hallazgos cuantitativos del ensayo de adhesión celular (Figura 60. El bloqueo de PD-L1 disminuye la adhesión celular inducida por *N. brasiliensis* en esplenocitos de ratón con actinomicetoma).

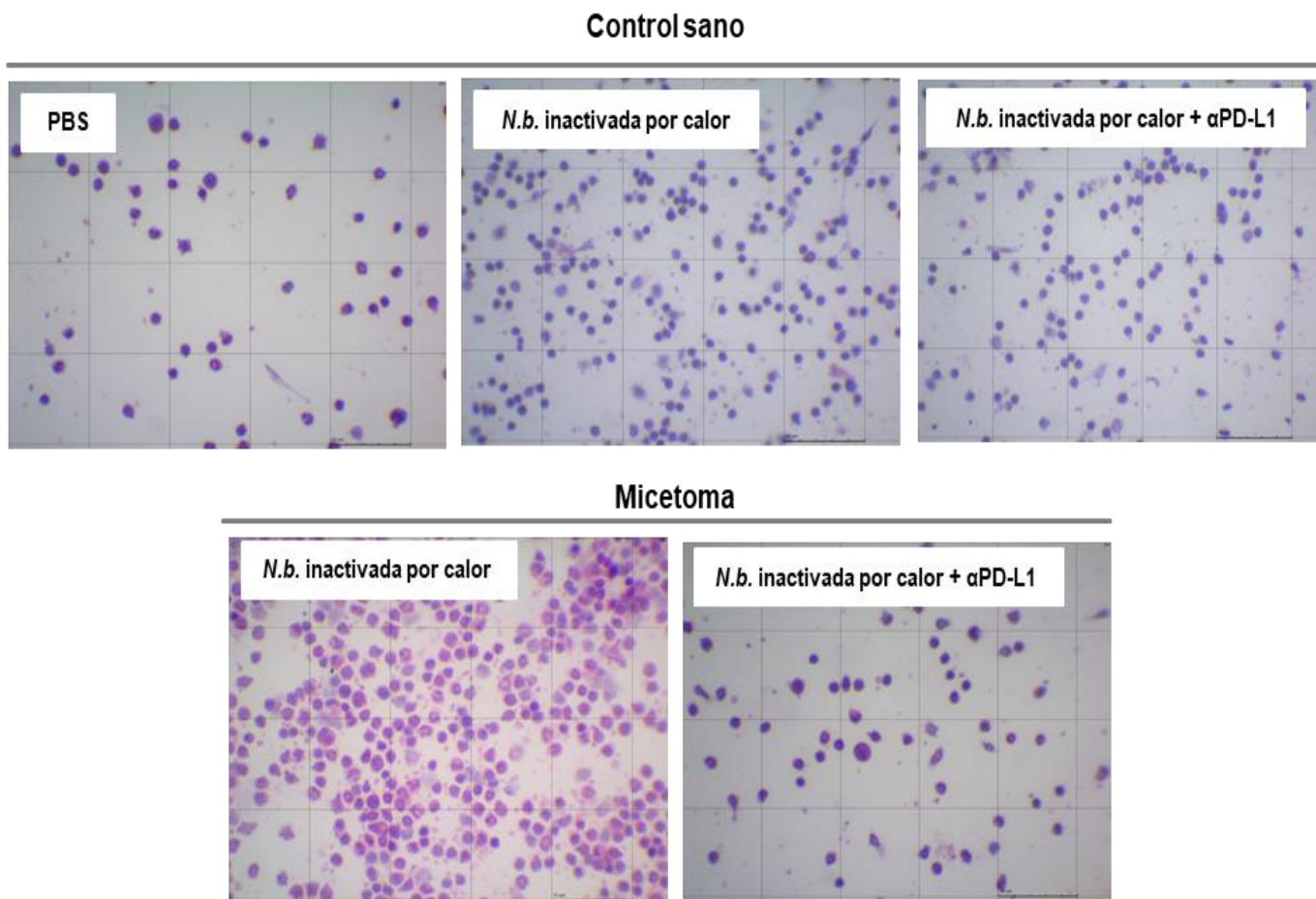


Figura 59. El bloqueo de PD-L1 revierte la hiperadhesión celular inducida por *N. brasiliensis* en esplenocitos de ratón con actinomycetoma

Tinción H&E (40X). Microfotografías representativas de los filtros de nitrocelulosa donde se observa la densidad celular y los patrones de distribución microscópica para cada una de las condiciones experimentales. Barra de escala: 50 μ m

En el grupo de animales con micetoma estimulados con *N. brasiliensis* inactivada por calor, se observó una marcada y densa acumulación de células mononucleares y polimorfonucleares adheridas a lo largo de los campos evaluados, lo que evidencia una intensa respuesta quimiotáctica y de anclaje celular (303.8 células por campo $\pm$ 88.97).

En contraste, las células provenientes del grupo con micetoma, que recibieron un bloqueo previo con el anticuerpo anti-PD-L1, exhibieron una drástica reducción en la densidad celular por campo (48.20 ± 4.589), con una distribución dispersa y escasa que se asemeja a los niveles basales observados en el grupo control sano sin estímulo (72.55 ± 6.140).

Por su parte, los esplenocitos de los ratones controles sanos mantuvieron una densidad celular moderada y homogénea tras el estímulo bacteriano directo (107.8 ± 5.757), sin variaciones cualitativas aparentes inducidas por la adición de anti-PD-L1 (75.55 ± 6.372).

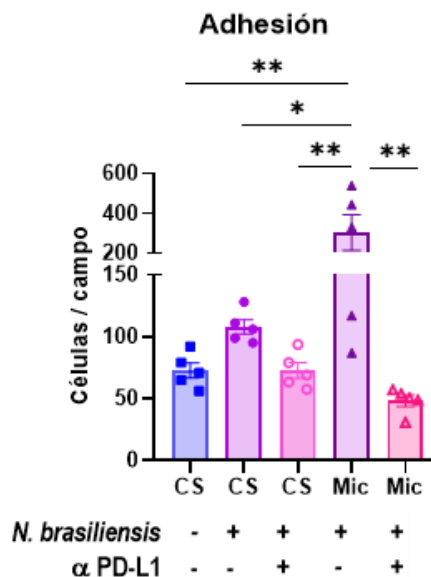


Figura 60. El bloqueo de PD-L1 disminuye la adhesión celular inducida por *N. brasiliensis* en esplenocitos de ratón con actinomietoma

Cuantificación de la adhesión celular en cámara de Boyden modificada. Se muestran los grupos de ratones controles sanos (CS) y con micetoma (Mic) a los 100 días post-infección, evaluados de forma basal, tras el estímulo con *N. brasiliensis* inactivada por calor, y bajo el efecto del bloqueo con el anticuerpo anti-PD-L1. Los datos cuantitativos se presentan como la media $\pm$ SEM de $n=5$ animales por grupo. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey.

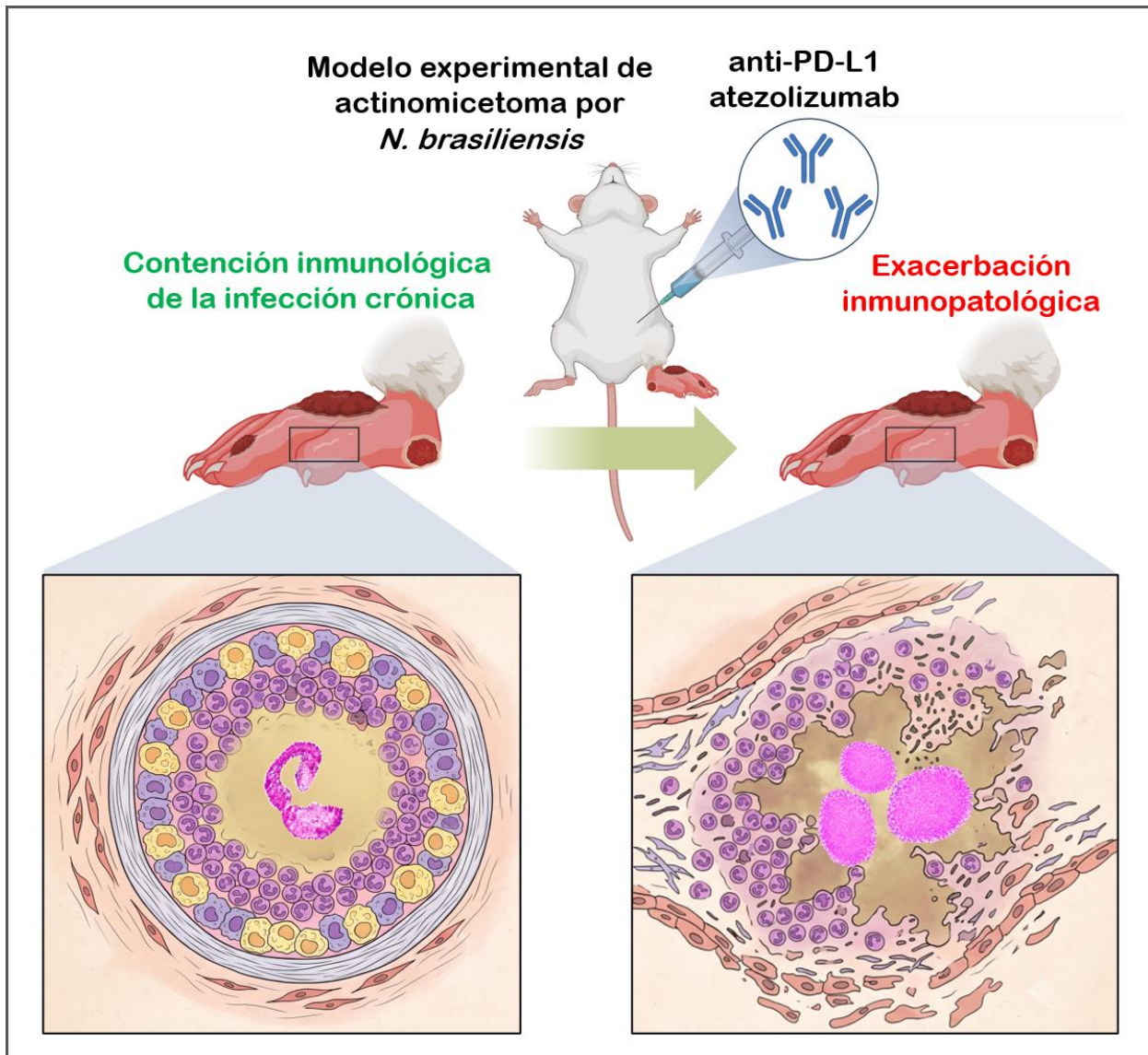


Figura 61. Resumen gráfico

Elaborada con Biorender <https://www.biorender.com/> y con Gemini <https://gemini.google.com/>.

9 DISCUSIÓN

La progresión inmunopatológica del actinomicetoma inducido por *N. brasiliensis* en el modelo murino BALB/c demuestra una compleja e ineficaz respuesta de compartimentalización que perpetúa un estado inflamatorio crónico.

La trayectoria lesional trifásica observada muestra una clara disociación fenotípica respecto de la carga bacteriana. Mientras que las UFC en el cojinete plantar se elevaron de manera sustancial entre los 70 y 100 dpi, el volumen de la lesión externa entró en una fase de aparente estabilización macroscópica.

Este fenómeno evidencia que los parámetros clínicos periféricos subestiman la gravedad del daño tisular interno, donde coexisten de manera simultánea la necrosis supurativa central, la paniculitis lobulillar difusa y la osteomielitis destructiva, daño que se observa en los pacientes con micetoma, el cual usualmente culmina en pérdida de la función del miembro afectado ⁷.

Esta falta de resolución evoca los perfiles inmunopatológicos de otras infecciones bacterianas crónicas causadas por bacilos ácido-alcohol resistentes, tales como *M. tuberculosis* ⁹⁷ y *M. leprae* ⁹⁸, en las cuales la respuesta inmune exacerbada del hospedero supera la citotoxicidad directa inducida por el patógeno.

Al analizar la celularidad local del granuloma por *N. brasiliensis* en la fase crónica, destaca un marcado contraste fenotípico en la infiltración linfoide en comparación con otros granulomas bacterianos clásicos.

En nuestro modelo, los linfocitos T CD3+ totales representan un componente minoritario y marginal en el tejido infectado (menor al 1%), distribuyéndose en

proporciones estables de linfocitos CD4⁺ (80%) y CD8⁺ (20%) del total de células CD3⁺. Al contrastar este perfil morfológico con el granuloma clásico de *M. tuberculosis*, se evidencian diferencias fundamentales: en la micobacteriosis, los linfocitos T infiltrantes son significativamente más abundantes y presentan una distribución equilibrada de subpoblaciones, reportándose un 40% de células CD4⁺ y un 30% de células CD8⁺ ⁷³.

Asimismo, el granuloma tuberculoso maduro se caracteriza por una celularidad predominantemente histiocítica con una alta densidad de macrófagos activados y células gigantes multinucleadas que coordinan la eliminación del patógeno ^{60,99}. Por el contrario, en el actinomicetoma crónico por *N. brasiliensis* se constata una depleción severa de macrófagos tisulares locales (menor al 2%), siendo reemplazados de forma masiva por un infiltrado purulento compuesto por PMN que superan el 90% de la población hematopoyética.

Esta infiltración leucocitaria ininterrumpida e indiscriminada es conducida por un fuerte gradiente de citocinas quimiotácticas locales y sistémicas. Se demostró una elevación persistente de IL-6 en el suero de los animales infectados, lo cual concuerda con la cinética descrita anteriormente por el grupo de trabajo, donde se demostró la expresión tisular crónica y sostenida de IL-6 en la periferia de los microabscesos y en músculo a los 90 dpi ³⁴. Por lo tanto, podemos afirmar que esta secreción sostenida de IL-6 es producto de las poblaciones de macrófagos locales activados y, de manera crucial, del daño metabólico intrínseco del tejido muscular esquelético profundo.

Esta producción de IL-6 local actúa como el principal promotor del reclutamiento indiscriminado de PMN y prolonga su supervivencia celular al inhibir sus vías apoptóticas convencionales ¹⁰⁰.

Paralelamente, observamos una disminución progresiva en los niveles séricos de la quimiocina MCP-1 (CCL2). En condiciones homeostáticas, el daño estromal activa el complejo IL-6/IL-6R α para inducir la secreción de MCP-1 y facilitar el reclutamiento de monocitos efectores para la depuración de detritos celulares ^{100,101}. La parálisis de este eje en nuestro modelo impide la transición hacia una fase resolutive histiocítica, un escenario molecular comparable al microambiente de desregulación leucocitaria observado en enfermedades inflamatorias crónicas no infecciosas como la artritis reumatoide ^{101,102}.

La incapacidad de los macrófagos para contener *N. brasiliensis* se debe a factores de virulencia estructurales del patógeno. Previamente se demostró que los lípidos específicos aislados de la pared celular de *Nocardia* ejercen un efecto inhibitorio directo sobre la capacidad fagocítica de los macrófagos e inducen una secreción aberrante de IL-6 en macrófagos derivados de médula ósea ³⁶. Esta inhibición fagocítica facilita la agregación bacteriana en filamentos densos que restringen mecánicamente el acceso celular ^{28,36,103}.

No obstante, los macrófagos que logran asentarse en la periferia del núcleo supurativo adquieren la morfología de macrófagos espumosos debido a la acumulación de detritos lipídicos membranales y ácidos micólicos ¹⁰⁴.

In vitro, se observó que los macrófagos expuestos al microambiente del micetoma adquieren un perfil de activación alternativa o fenotipo M2, caracterizado por la secreción activa de citocinas antiinflamatorias y profibróticas como IL-4 e IL-13, promoviendo la vacuolización citoplasmática y la diferenciación a células espumosas^{35,105}. Esta polarización local hacia una respuesta inmunológica de tipo Th2 y M2 es biológicamente esperada en nuestro modelo experimental, dado que la cepa de ratones BALB/c posee un trasfondo genético con un sesgo inherente hacia perfiles humorales Th2, a diferencia de la cepa C57BL/6, la cual induce respuestas celulares de tipo Th1 marcadamente restrictivas^{106,107}.

Estos hallazgos observados en el modelo murino mimetizan con precisión la fisiopatología clínica humana. En sueros de pacientes con actinomicetoma crónico que no han sido sometidos a desbridamiento quirúrgico para remover la masa lesional, se han detectado de forma sistemática niveles elevados de IL-6, IFN- γ , IL-4 e IL-13¹⁰⁸. Esta ineficacia adaptativa se ve reforzada por la pérdida de la regulación homeostática local: el compartimento de células Treg y la secreción de IL-10 caen durante la fase crónica (60 dpi), eliminando el freno regulador sobre el eje Th17 estimulado por IL-6, lo que perpetúa el reclutamiento de PMN y la destrucción tisular focalizada^{34,39}.

A nivel celular, la persistencia del estímulo antigénico crónico y la hiperestimulación por IL-6 impactan directamente la señalización molecular de los linfocitos efectores. La estimulación sostenida con IL-6 en combinación con la activación del TCR mediante el complejo CD3/CD28 en linfocitos T CD8+, induce una modulación positiva de la expresión del factor de transcripción transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3)¹⁰⁹. La hiperactivación de STAT3 mitiga de forma directa

la transcripción de mediadores protectores clave, disminuyendo significativamente la expresión de IFNG y CCL2 ^{110,111}. Este mecanismo molecular proporciona el fundamento molecular del fenómeno de agotamiento celular en el micetoma, donde las células pierden su capacidad efectora frente al patógeno ⁴³.

Nuestros hallazgos en los órganos linfoides secundarios aportan una pieza clave para comprender la dimensión sistémica de la inmunopatología del actinomicetoma. La linfadenomegalia poplítea y la esplenomegalia masiva documentadas no constituyen eventos hiperplásicos reactivos convencionales, sino que reflejan una hematopoyesis extramedular.

En el bazo, el porcentaje de neutrófilos Ly6G+ experimentó un incremento drástico, escalando desde un valor basal de 5% en los controles sanos hasta un 48% durante la cronicidad de la infección. Este viraje mieloide masivo, caracterizado por el desplazamiento de la celularidad esplénica nativa, es una evidencia patognomónica de la instauración de una granulopoyesis de emergencia ¹¹² para sostener el flujo ininterrumpido de millones de PMN hacia el núcleo lesional.

Como consecuencia directa de esta expansión mieloide, las poblaciones totales de linfocitos T CD3+ sufrieron una depleción severa tanto en el bazo como en el ganglio poplíteo drenante (disminuyendo del 28% al 8%). Este secuestro ¹¹³ o dilución del compartimento linfoide corrobora la respuesta adaptativa, donde el hospedero prioriza la producción masiva de linajes innatos supurativos, disminuyendo la celularidad linfoide.

Tomando en consideración la totalidad de estas evidencias, se estableció la justificación metodológica para dar continuidad a esta investigación mediante la caracterización fenotípica de las moléculas de punto de control inmunitario PD-1 y PD-L1 en las subpoblaciones celulares infiltrantes de la lesión y órganos periféricos en nuestro modelo experimental.

Esto demuestra que el actinomicetoma crónico inducido por *N. brasiliensis* está supeditado al desequilibrio inmune del hospedero, constituyendo el motor primario de la patología en las fases avanzadas de la infección.

La caracterización del eje de puntos de control inmunitario PD-1/PD-L1 en los leucocitos de los diferentes tejidos analizados revela una regulación compartimentalizada y diferencial que depende críticamente del microambiente tisular y del tiempo de evolución de la infección por *N. brasiliensis*.

El hallazgo más relevante en el cojinete plantar es el incremento en la MFI de PD-1 los linfocitos T CD8+. Esta inducción selectiva y tardía de PD-1 constituye una firma molecular característica del fenómeno de agotamiento inmune mediado por la persistencia del estímulo antigénico del actinomiceto ^{114,115}.

Este patrón de sobreexpresión local coincide con lo observado en otros modelos de infecciones bacterianas crónicas; específicamente, en la infección pulmonar por *M. tuberculosis* en macacos rhesus, los linfocitos T antígeno-específicos recuperados directamente de biopsias de tejido de pulmón, y no de órganos periféricos como el bazo o el ganglio linfático drenante, exhibieron una regulación positiva de PD-1, tanto en el linaje CD4+ como en el CD8+ ⁶⁴. La restricción espacial de este fenómeno subraya que

las señales de atenuación inmunológica son exacerbadas por el contacto prolongado con las estructuras de contención granulomatosa.

En el compartimento mieloide local del actinomicetoma, se determinó que la regulación del ligando PD-L1 presenta un patrón tisular único y sobreexpresado, en comparación con los órganos linfoides secundarios. Los neutrófilos provenientes del sitio de la lesión alcanzaron los niveles de MFI de PD-L1 más elevados de todo el sistema, consolidando a esta población innata no solo como un elemento efector supurativo, sino como un supresor celular activo en la interfase del grano bacteriano.

Esta distribución arquitectónica molecular guarda una analogía directa con los hallazgos descritos en biopsias de pacientes con tuberculosis activa, donde las células T CD4⁺ del núcleo del granuloma expresan constitutivamente PD-1, mientras que las células mieloides circundantes, tales como macrófagos y neutrófilos, expresan de forma masiva su ligando PD-L1 ⁷³.

Como se ha sistematizado previamente en la literatura de inmunología comparada en escenarios de tuberculosis, el granuloma representa un nicho de contención metabólica ⁹⁹ donde existe un flujo de señales orquestado por citocinas entre el núcleo mieloide central y la corona linfoide periférica ⁷³. En este contexto molecular, el incremento masivo de ligandos de puntos de control en las células mieloides del tejido infectado, incluyendo macrófagos clásicos, espumosos y células dendríticas en fases tardías de la infección ^{77,116}, responde a estímulos inflamatorios crónicos.

Asimismo, los neutrófilos clásicos y los granulocitos de baja densidad locales expresan niveles marcadamente elevados de PD-L1 ^{78,117}, adquiriendo un comportamiento

regulador análogo al de las células supresoras derivadas de la línea mieloide (MDSC) descritas en el microambiente tumoral.

Una característica crítica de estas regiones ricas en células mieloides es que el número de células PD-L1+ supera de manera sobresaliente al de linfocitos PD-1+ ⁷³, lo cual transforma al núcleo supurativo del actinomicetoma en un nicho local sumamente inmunosupresor ¹¹⁸.

Con base en lo anterior, proponemos que la interacción contigua entre el PMN local PD-L1+ y el linfocito T citotóxico local PD-1+ opera como un escudo molecular que anula la actividad lítica de las células CD8+, limitando el daño citopático colateral en el estroma circundante, pero favoreciendo la viabilidad y persistencia del grano filamentoso de *N. brasiliensis*.

A nivel de los órganos linfoides secundarios, la dinámica de este eje regulador mostró un comportamiento diferencial que refleja la disparidad entre el drenaje linfático regional y la respuesta sistémica. En el ganglio linfático poplíteo, la expresión de PD-1 en linfocitos CD4+ y CD8+ mostró un incremento progresivo a lo largo de la fase crónica, lo cual se asocia al flujo constante de antígenos solubles y células presentadoras de antígeno migratorias desde la extremidad infectada ¹¹⁹.

Por el contrario, en el bazo se constató una disminución paradójica y significativa en la MFI de PD-1 en ambos linajes de linfocitos T durante la infección crónica, respecto a los controles sanos. Esta aparente regulación negativa periférica debe interpretarse en conjunto con el fenómeno de mielopoyesis de emergencia discutido previamente. La expansión masiva de precursores granulocíticos inducida en el bazo desplaza y diluye

los nichos linfoides convencionales; por lo tanto, la reducción de PD-1 en los linfocitos T esplénicos residuales sugiere que estas células permanecen en un estado quiescente o no activado ¹²⁰, ajenas al microambiente inflamatorio del cojinete plantar, lo que confirma que el agotamiento celular es un proceso estrictamente compartimentalizado y restringido a los frentes de invasión activa.

De manera concordante, las células mieloides del bazo evidenciaron una dicotomía molecular en la expresión de PD-L1: mientras que los neutrófilos esplénicos disminuyeron su MFI, los macrófagos aumentaron de forma sostenida la expresión del ligando, lo que puede constituir un mecanismo adaptativo sistémico frente a la inflamación.

Es fundamental destacar que, si bien la inducción del eje PD-1/PD-L1 tradicionalmente se asocia con anergia funcional, la evidencia en modelos preclínicos demuestra que este sistema de puntos de control inmune es un requerimiento biológico indispensable para la preservación de la arquitectura tisular. En modelos animales infectados con micobacterias, la ausencia del eje PD-1/PD-L1 resulta en una proliferación bacteriana descontrolada, la formación de granulomas aberrantes e inmaduros, un influjo neutrofílico deletéreo masivo y un incremento crítico en las concentraciones de citocinas proinflamatorias sistémicas, correlacionando con tasas de supervivencia drásticamente reducidas ^{63,64,121}.

Por lo tanto, la expresión local acentuada de este eje en el actinomicetoma no debe interpretarse únicamente como un éxito de evasión del patógeno, sino como un

mecanismo homeostático del hospedero diseñado para evitar una respuesta inmune que causaría una lisis tisular sistémica fulminante.

Esta dualidad biológica valida la pertinencia de evaluar el bloqueo farmacológico controlado de este eje en nuestro modelo; los hallazgos demuestran que el hospedero cuenta con las poblaciones efectoras en el foco de la infección, pero estas se encuentran bajo un secuestro funcional local, justificando la intervención terapéutica dirigida a liberar este freno molecular para restaurar la inmunidad adaptativa celular protectora en fases avanzadas del micetoma.

Los resultados muestran que el actinomicetoma crónico inducido por *N. brasiliensis* está supeditado a un equilibrio inmune, donde la presencia del eje PD-1/PD-L1 confirma que el nicho regulador local del microabsceso opera como el motor primario de la persistencia del patógeno y del daño destructivo en las fases avanzadas de la infección.

La evaluación funcional del eje PD-1/PD-L1 mediante el bloqueo farmacológico revela una dicotomía crítica en la biología de los puntos de control inmunitario: este sistema molecular, consolidado como un blanco terapéutico exitoso y revolucionario en la oncología médica ¹²², ejerce un papel protector e indispensable para la supervivencia del hospedero en el contexto del actinomicetoma crónico por *N. brasiliensis*. Este hallazgo posiciona a la vía PD-1/PD-L1 como un regulador del equilibrio inmunológico dentro del tejido granulomatoso, un fenómeno biológico análogo al descrito en los modelos de infección por *M. tuberculosis* en macacos rhesus ⁶⁴.

Este escenario replica de manera precisa la reactivación fulminante de infecciones latentes como la tuberculosis en pacientes oncológicos tratados con ICI ³⁷. Debido a la coexistencia epidemiológica de estas patologías granulomatosas y las neoplasias en regiones endémicas, estos resultados alertan sobre la necesidad de implementar protocolos de cribado de infecciones subclínicas antes de iniciar inmunoterapias.

En nuestro modelo, el bloqueo terapéutico de PD-L1 mediante la administración sistémica del anticuerpo monoclonal atezolizumab no indujo ningún beneficio clínico ni decremento en la inflamación local; por el contrario, desencadenó una alarmante e inesperada mortalidad dosis-dependiente que abatió la tasa de supervivencia al 38% al término del protocolo experimental.

El seguimiento clínico demostró que este desenlace fatal estaba dissociado de los cambios macroscópicos en el volumen del cojinete plantar. Esta falta de correlación clínica indica que la pérdida homeostática subyacente responde a una desorganización de la arquitectura tisular y a una desregulación molecular sistémica, más que a un incremento inflamatorio localizado en la extremidad infectada.

En contraste con la hipótesis inicial de que bloquear PD-L1 restauraría la inmunidad protectora contra el actinomicetoma, los resultados muestran que inhibir este punto de control agrava la infección y reduce la supervivencia del hospedero. Este hallazgo desafía la idea de que el eje PD-1/PD-L1 actúa únicamente como un mecanismo de evasión, y coincide con observaciones en modelos granulomatosos como la tuberculosis y la lepra, donde la ausencia de este eje provoca hiperinflamación y

diseminación tisular ¹²³⁻¹²⁵. Estos hallazgos cuestionan la aplicabilidad universal de las estrategias inmunoterapéuticas oncológicas en infecciones crónicas.

Un hallazgo central es la compartimentalización de la respuesta inmune, tanto celular como humoral. El hecho de que las escasas células T infiltrantes exhibieran niveles basales críticamente elevados de PD-1, y que el tratamiento no fuera capaz de revertir esta firma ni de reclutar nuevas poblaciones linfoides efectoras, sugiere la existencia de un defecto intrínseco en el reclutamiento de la inmunidad adaptativa, evidenciado por la disminución de MCP-1 durante la fase crónica de la infección ¹²⁶.

Por los resultados observados, se afirma que la expresión local acentuada de PD-1 no caracteriza a una población terminalmente disfuncional o agotada sistémicamente, sino a un fenotipo efector que opera bajo supresión local ⁵⁷. El microambiente del micetoma humano ¹²⁷, reproducido fielmente en nuestro modelo experimental ²⁷, constituye un entorno donde el bloqueo de puntos de control es incapaz de corregir la exclusión linfoide local.

La selección de atezolizumab como agente terapéutico fue rigurosamente fundamentada. Atezolizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado de isotipo IgG1 que posee la mutación molecular N297A en la cadena pesada, la cual abolirá de forma absoluta la glucosilación del dominio Fc. Esta modificación estructural es crucial en inmunología experimental, ya que anula las funciones efectoras mediadas por Fc, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) ⁸², asegurando que los efectos deletéreos observados deriven estrictamente del bloqueo del flujo de señalización del

eje PD-1/PD-L1 y no de una depleción celular artificial de las poblaciones mieloides que expresan el ligando ¹²⁸.

Asimismo, a pesar de las barreras estructurales interespecies que limitan el uso de anticuerpos humanizados en roedores, atezolizumab representa una excepción biológica debido a su documentada reactividad cruzada y su elevada afinidad por el ortólogo murino de PD-L1, la cual es incluso superior a la afinidad reportada por la molécula humana ⁸⁰.

Dado que en la literatura no existen reportes de mortalidad o toxicidad sistémica idiopática inducida por este anticuerpo en ratones sanos ^{80-82,91}, lo cual fue corroborado en nuestros grupos control sanos tratados, confirmamos que la letalidad es un evento patológico exclusivo del binomio hospedero-infección bajo el estímulo crónico de *N. brasiliensis*.

La ausencia de signos clínicos clásicos de sepsis fulminante y el mantenimiento de los niveles basales de citocinas pirógenas convencionales como IL-6 sérica, TNF- α e IFN- γ no descartan un estado de choque, sino que reflejan un complejo fenómeno de parálisis inmunológica sistémica.

El tratamiento con cuatro dosis de atezolizumab indujo un perfil de citocinas séricas paradójico, caracterizado por la elevación sincrónica y masiva de la citocina Th1 IL-12p70 y de la citocina inmunorreguladora IL-10. La liberación de la forma bioactiva de IL-12p70 actúa como un sensor endocrino del sistema inmune que detecta la diseminación bacteriana latente. Sin embargo, esta señal es inmediatamente contrarrestada por la secreción masiva de IL-10, la cual opera como un supresor

transcripcional crítico de IL-6 y TNF- α ^{35,129,130}. Este circuito de retroalimentación molecular podría ser una explicación sobre los bajos niveles de marcadores clásicos de la tormenta de citocinas, conduciendo a los animales a un colapso homeostático terminal y fulminante evadiendo las vías inflamatorias tradicionales.

A nivel histopatológico y morfométrico, el colapso sistémico correlacionó de manera directa con una pérdida absoluta de la capacidad de compartimentalización en los animales sobrevivientes. Mientras que los controles infectados mantuvieron microabscesos dérmicos bien delimitados que confinaban al grano bacteriano y preservaban el estroma periférico, los especímenes sometidos al bloqueo con atezolizumab exhibieron extenso daño histopatológico.

De forma alarmante, el análisis morfométrico demostró que el bloqueo del eje indujo una remodelación geométrica aberrante del grano actinomicótico, el cual incrementó significativamente su área, perímetro y su índice de circularidad, correlacionando con una elevación exponencial y dosis-dependiente de la carga bacteriana local.

El hecho de que atezolizumab no altere el control microbiano ni induzca mortalidad en modelos murinos oncológicos convencionales ^{80,82,91,128} demuestra de manera irrefutable que la desregulación fatal es un evento dependiente del contexto infeccioso crónico, mimetizando de forma precisa los reportes clínicos de reactivación fulminante de tuberculosis en pacientes con cáncer sometidos a terapias con ICI ¹³¹⁻¹³⁵. Nuestro modelo aporta evidencia de estos eventos adversos y demuestra que el punto de control PD-1/PD-L1 es necesario para mantener la integridad estructural del granuloma.

Finalmente, los ensayos funcionales *in vitro* aportan la evidencia mecanicista sobre cómo el microambiente crónico altera la susceptibilidad celular y desestabiliza la contención física del actinomicetoma. Por un lado, el ensayo de proliferación de esplenocitos demostró que la infección por *N. brasiliensis* rompe la respuesta homeostática clonal observada en animales sanos, induciendo una marcada heterogeneidad biológica en la capacidad replicativa linfoide tras el bloqueo de PD-L1.

Por otro lado, de manera crucial, el ensayo de quimiotaxis y adhesión en cámara de Boyden reveló que el bloqueo de PD-L1 abate drásticamente la densidad celular y la capacidad de anclaje de los leucocitos expuestos al antígeno bacteriano. Este hallazgo demuestra cuantitativamente que el eje PD-1/PD-L1 regula de forma directa las moléculas de adhesión celular e integrinas en las poblaciones efectoras durante la fase crónica.

Se constata que la interrupción farmacológica de esta vía desmantela las fuerzas de cohesión y anclaje necesarias para mantener la corona celular compacta del granuloma¹²⁶. Al perderse este freno y control migratorio intracelular, la arquitectura de contención histológica se colapsa, facilitando la expansión aberrante del grano actinomicótico, la proliferación bacteriana masiva y el consecuente desenlace fatal en el hospedero^{63–65}.

Por todo lo anterior, nuestro estudio establece que la vía de señalización PD-1/PD-L1 es un componente homeostático indispensable para el mantenimiento de la contención inmunológica y la supervivencia del hospedero en el actinomicetoma crónico por *N. brasiliensis*. Su bloqueo terapéutico desarma los mecanismos de adhesión y

compartimentalización celular, liberando una expansión bacteriana aberrante y una disfunción molecular sistémica. Estos hallazgos alertan sobre el riesgo crítico latente que representa la inhibición de puntos de control inmunitario en pacientes oncológicos con infecciones bacterianas crónicas granulomatosas subyacentes.

10 CONCLUSIÓN

Se rechaza la hipótesis alterna. El uso de un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 contribuye significativamente a la exacerbación de la infección crónica en el actinomicetoma por *N. brasiliensis* en el modelo experimental en ratones BALB/c.

11 LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

1. **Empleo de un único modelo murino:** La cepa BALB/c presenta un sesgo genético hacia respuestas inmunológicas de tipo Th2, lo que influye en la respuesta inflamatoria. **Perspectiva:** Replicar los hallazgos en otras cepas murinas, como la C57BL/6 (con sesgo Th1), para determinar si el papel protector del eje PD-1/PD-L1 es un fenómeno dependiente del contexto de la inmunidad adaptativa. Asimismo, evaluar el bloqueo en modelos humanizados o en cepas con depleción de subpoblaciones celulares específicas.
2. **Evaluación de un solo punto de control inmune:** El trabajo se centró en la vía PD-1/PD-L1, sin explorar otros mecanismos inhibitorios como TIM-3, LAG-3 o CTLA-4, que podrían actuar de manera sinérgica o redundante en el microambiente del actinomicetoma. **Perspectiva:** Realizar un análisis de la expresión de otros receptores inhibitorios en las poblaciones leucocitarias infiltrantes del actinomicetoma y en los órganos linfoides secundarios. Adicionalmente, evaluar el bloqueo combinado de múltiples puntos de control.
3. **Uso de un anticuerpo monoclonal humanizado en un modelo murino:** El uso de atezolizumab, presenta limitaciones debido a su posible inmunogenicidad. La generación de anticuerpos antidroga y las diferencias estructurales entre especies, que podrían alterar su afinidad de unión, su farmacocinética y su biodisponibilidad. **Perspectiva:** Cuantificar los anticuerpos antidroga (anti-atezolizumab) en muestras de suero de animales tratados mediante un ensayo de ELISA indirecto. Asimismo, evaluar el bloqueo mediante anticuerpos anti-PD-L1 murinos y realizar estudios de dosis-respuesta.

4. **Ausencia de análisis de mecanismos moleculares intracelulares:** El estudio carece de un análisis molecular que permita dilucidar las vías de señalización intracelulares implicadas en la regulación del eje PD-1/PD-L1 durante la infección, como la activación de STAT3, NF- κ B o IRF4. **Perspectiva:** Determinar el perfil de expresión génica y otros factores de transcripción en células del microambiente del actinomicetoma mediante PCR cuantitativa en tiempo real, para correlacionar la activación molecular y el agotamiento inmunológico observados. Además, implementar RNA-seq y espectrometría de masas para caracterizar el perfil transcriptómico y proteómico del tejido infectado en condiciones basales y tras el bloqueo de PD-L1.
5. **Caracterización funcional de las poblaciones mieloides:** Se cuantificaron los porcentajes de neutrófilos y macrófagos, así como quimiotaxis; sin embargo, no se realizaron ensayos funcionales que permitieran evaluar su estado de activación, capacidad fagocítica, producción de especies reactivas de oxígeno o formación de trampas extracelulares durante el bloqueo de PD-L1. **Perspectiva:** Estudiar las poblaciones mieloides para identificar cambios funcionales tras el bloqueo de PD-L1.
6. **Evaluación limitada al compartimento celular y tisular:** El estudio se centró en poblaciones celulares infiltrantes y en el microambiente local del actinomicetoma, sin explorar la respuesta humoral específica, el depósito de complejos inmunes o el daño a órganos sistémicos. **Perspectiva:** Cuantificar los títulos de anticuerpos séricos específicos anti-*N. brasiliensis* (anti-Nb) mediante ELISA indirecto, para establecer el impacto del bloqueo de PD-L1 en la activación y la cooperación de la respuesta linfocitaria B periférica. Asimismo, evaluar el depósito de complejos

inmunes en biopsias de riñón mediante inmunofluorescencia, para determinar si los cambios en las citocinas sistémicas estuvieron mediados por una glomerulonefritis membranoproliferativa secundaria que pudiera explicar la mortalidad observada.

7. **Evaluación en la fase crónica de la infección:** El estudio se limitó a la fase crónica (70-100 dpi), sin explorar el impacto del bloqueo de PD-L1 en fases más tempranas de la infección, en las que la respuesta inmunológica podría ser más susceptible a la modulación farmacológica. **Perspectiva:** Evaluar el bloqueo de PD-L1 en las fases aguda, subaguda y crónica para determinar si el efecto observado depende del tiempo de evolución.
8. **Ausencia de terapia antimicrobiana convencional:** El estudio evaluó el bloqueo de PD-L1 como monoterapia, sin explorar su posible sinergia con el tratamiento antibiótico, que constituye el estándar de manejo clínico en pacientes con actinomicetoma. **Perspectiva:** Evaluar el bloqueo de PD-L1 en combinación con la terapia antimicrobiana, como trimetoprim-sulfametoxazol, amikacina o imipenem, para determinar si la administración conjunta podría modular la respuesta inmunológica sin comprometer el control bacteriano.
9. **Falta de evaluación de otros órganos y tejidos:** El estudio se centró en el actinomicetoma y en órganos linfoides secundarios (ganglio poplíteo y bazo), sin explorar el impacto sistémico del bloqueo de PD-L1 en otros órganos, como el pulmón, el hígado o el riñón, donde ocurren fenómenos inflamatorios subclínicos. **Perspectiva:** Ampliar el análisis histopatológico a otros órganos durante el tratamiento con anti-PD-L1, para identificar posibles fenómenos de toxicidad sistémica.

12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Young D, Hussell T, Dougan G. Chronic bacterial infections: living with unwanted guests. *Nat Immunol.* 2002;3(11):1026-1032. doi:10.1038/ni1102-1026
2. Hay RJ. Mycetoma – a history of the first contributions to the description of the disease and its pathogenesis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2021;115(4):283-286. doi:10.1093/trstmh/traa134
3. Barroeta S, Lavallo P, Mahgoub E, Mariat F, Segretain G. Memorias del II Simposio Internacional de Micetomas. *Eds. Grupo Internacional de Investigación en Actinomicetos Patógenos.* Preprint posted online 1987:62.
4. Agarwal P, Jagati A, Rathod SP, Kalra K, Patel S, Chaudhari M. Clinical Features of Mycetoma and the Appropriate Treatment Options. *Res Rep Trop Med.* 2021;Volume 12:173-179. doi:10.2147/rrtm.s282266
5. Verma P, Jha A. Mycetoma: reviewing a neglected disease. *Clin Exp Dermatol. Blackwell Publishing Ltd.* 2019;44(2):123-129. doi:10.1111/ced.13642
6. Global Health D of PD and M. Neglected Tropical Diseases. 2022. Accessed October 23, 2022. <https://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/>
7. Abbas M, Scolding PS, Yosif AA, et al. The disabling consequences of Mycetoma. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(12). doi:10.1371/journal.pntd.0007019
8. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Bonifaz A, et al. [Update on the epidemiology of mycetoma in Mexico. A review of 3933 cases]. *Gac Med Mex.* 2013;149(5):586-592. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24108347>
9. van de Sande WWJ. Global Burden of Human Mycetoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(11). doi:10.1371/journal.pntd.0002550
10. *Results of the 2017 Global WHO on Mycetoma.* 2018. Accessed May 26, 2026. <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/6c3d4df8-02df-4618-9613-23cbb75ad7f4/content>
11. Vera-Cabrera L, Salinas-Carmona MC, Welsh O, Rodriguez MA. Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. *J Clin Microbiol.* 1992;30(5):1183-1188. doi:10.1128/jcm.30.5.1183-1188.1992
12. Dodiuk-Gad R, Cohen E, Ziv M, et al. Cutaneous nocardiosis: Report of two cases and review of the literature. *Int J Dermatol.* 2010;49(12):1380-1385. doi:10.1111/j.1365-4632.2010.04554.x
13. Fahal AH, Bakhiet SM. Mycetoma and the environment. Nosanchuk J, ed. *PLoS Negl Trop Dis.* 2023;17(11):e0011736. doi:10.1371/journal.pntd.0011736

14. Bonifaz A, Tirado-Sánchez A, Calderón L, et al. Mycetoma: Experience of 482 Cases in a Single Center in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(8). doi:10.1371/journal.pntd.0003102
15. Cardenas-De la Garza JA, Welsh O, Cuellar-Barboza A, et al. Climate, soil type, and geographic distribution of actinomycetoma cases in Northeast Mexico: A cross-sectional study. *PLoS One.* 2020;15(5). doi:10.1371/journal.pone.0232556
16. Salinas-Carmona MC. Nocardia brasiliensis: From microbe to human and experimental infections. *Microbes Infect.* 2000;2(11):1373-1381. doi:10.1016/S1286-4579(00)01291-0
17. Cruz Correa OF, Vega Sánchez DC, Ramírez Hobak L, Arenas Guzmán R. Mycetoma. A Report of 174 Cases Studied in 30 Years in a General Hospital in Mexico City (1987-2017). *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica.* 2018;16(4):263-267.
18. Pujic P, Beaman BL, Ravalison M, Boiron P, Rodríguez-Nava V. Nocardia and Actinomyces. In: *Molecular Medical Microbiology.* Elsevier; 2014:731-752. doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00040-8
19. Yamate R, Matono T, Yaguchi T, et al. Disseminated nocardiosis with Nocardia brasiliensis bacteremia in a patient with rheumatoid arthritis using tocilizumab. *J Infect Chemother.* 2019;25(7):552-555. doi:10.1016/j.jiac.2019.02.005
20. Ahmed AA, van de Sande W, Fahal AH. Mycetoma laboratory diagnosis: Review article. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(8):e0005638. doi:10.1371/journal.pntd.0005638
21. Toyokawa M, Ohana N, Ueda A, et al. Identification and antimicrobial susceptibility profiles of Nocardia species clinically isolated in Japan. *Sci Rep.* 2021;11(1):1-11. doi:10.1038/s41598-021-95870-2
22. Procop GW, Church DL, Hall GS, Jnda WM, Koneman EW. Actinomycetos aerobios. In: *Koneman. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas.* 7th ed. Wolters Kluwer; 2018:960-982.
23. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ. Clinical and laboratory features of the Nocardia spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(2):259-282. doi:10.1128/CMR.19.2.259-282.2006
24. Mifuji Lira RM, Limón Flores AY, Salinas Carmona MC, Ortiz Stern A. Experimental granulomatous pulmonary nocardiosis in BALB/c mice. *PLoS One.* 2016;11(6). doi:10.1371/journal.pone.0157475
25. Silva CL, Faccioli LH. Tumor necrosis factor and macrophage activation are important in clearance of Nocardia brasiliensis from the livers and spleens of mice. *Infect Immun.* 1992;60(9):3566-3570. doi:10.1128/iai.60.9.3566-3570.1992

26. Beaman L, Beaman B. The timing of exposure of mononuclear phagocytes to recombinant interferon γ and recombinant tumor necrosis factor α alters interactions with *Nocardia asteroides*. *J Leukoc Biol.* 1992;51(3):276-281. doi:10.1002/jlb.51.3.276
27. 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;67(5):2428-2432. doi:10.1128/iai.67.5.2428-2432.1999
28. Hassan Fahal A, Ahmed AO, El Hassan L, Saeed AA. The contribution of mycetoma grains to suboptimal disease management. *Nat Commun.* 2025;16(1):9855. doi:10.1038/s41467-025-64908-8
29. Conde C, Mancilla R, Fresan M, Ortiz Ortiz L. Immunoglobulin and complement in tissues of mice infected with *Nocardia brasiliensis*. *Infect Immun.* 1983;40(3):1218-1222. doi:10.1128/iai.40.3.1218-1222.1983
30. García-Hernández M, Castro-Corona MA, Segoviano-Ramírez JC, Brattig NW, Medina-De la Garza CE. Immunomodulatory effect of diethylcarbamazine in mice infected with *Nocardia brasiliensis*. *Int Immunopharmacol.* 2014;23(1):113-120. doi:10.1016/j.intimp.2014.08.004
31. Vera-Cabrera L, Ortiz-Lopez R, Elizondo-Gonzalez R, Ocampo-Candiani J. Complete Genome Sequence Analysis of *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 Reveals a Saprobic Lifestyle and the Genes Needed for Human Pathogenesis. *PLoS One.* 2013;8(6). doi:10.1371/journal.pone.0065425
32. Gonzalez-Suarez ML, Salinas-Carmona MC, Pérez-Rivera I. IgM but not IgG monoclonal anti-*Nocardia brasiliensis* antibodies confer protection against experimental actinomycetoma in BALB/c mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;57(1):17-24. doi:10.1111/j.1574-695X.2009.00575.x
33. Ruiz-De la Cruz ML, Vazquez -Marmolejo A V., Mejia-Torres MG, Castro-Corona M 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):1268-1278. doi:10.22038/ijbms.2025.87349.18875
34. Solis-Soto JM, Quintanilla-Rodriguez LE, Meester I, Segoviano-Ramirez JC, Vazquez-Juarez JL, Salinas Carmona MC. In situ detection and distribution of inflammatory cytokines during the course of infection with *Nocardia brasiliensis*. *Histol Histopathol.* 2008;23(5):573-581. doi:10.14670/HH-23.573
35. 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.* 2014;9(6):e100064. doi:10.1371/journal.pone.0100064

36. 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;80(10):3587-3601. doi:10.1128/IAI.00446-12
37. Ruiz-de la Cruz ML, Salinas-Carmona MC. The immune exhaustion paradox: activated functionality during chronic bacterial infections. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2024;18(12):1824-1836. doi:10.3855/jidc.19754
38. Gern BH, Adams KN, Plumlee CR, et al. TGF β restricts expansion, survival, and function of T cells within the tuberculous granuloma. *Cell Host Microbe*. 2021;29(4):594-606.e6. doi:10.1016/j.chom.2021.02.005
39. 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;80(7):2493-2499. doi:10.1128/IAI.06307-11
40. Siddig EE, Mohammed Edris AM, Bakhiet SM, van de Sande WWJ, Fahal AH. Interleukin-17 and matrix metalloprotease-9 expression in the mycetoma granuloma. Samy AM, ed. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(7):e0007351. doi:10.1371/journal.pntd.0007351
41. Usui T, Nagumo Y, Watanabe A, et al. Brasilicardin A, a Natural Immunosuppressant, Targets Amino Acid Transport System L. *Chem Biol*. 2006;13(11):1153-1160. doi:10.1016/j.chembiol.2006.09.006
42. Engelbrecht A, Saad H, Gross H, Kaysser L. Natural Products from Nocardia and Their Role in Pathogenicity. *Microb Physiol. S. Karger AG*. 2021;31(3):217-232. doi:10.1159/000516864
43. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011;12(6):492-499. doi:10.1038/ni.2035
44. Blank CU, Haining WN, Held W, et al. Defining 'T cell exhaustion.' *Nat Rev Immunol*. 2019;19(11):665-674. doi:10.1038/s41577-019-0221-9
45. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(8):486-499. doi:10.1038/nri3862
46. Keir ME, Liang SC, Guleria I, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine*. 2006;203(4):883-895. doi:10.1084/jem.20051776
47. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature*. 1987;328(6127):267-270. doi:10.1038/328267a0

48. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med.* 1995;182(2):459-465. doi:10.1084/jem.182.2.459
49. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992;11(11):3887-3895. doi:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x
50. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(19):12293-12297. doi:10.1073/pnas.192461099
51. Ahmed M, Tezera LB, Elkington PT, Leslie AJ. The paradox of immune checkpoint inhibition re-activating tuberculosis. *European Respiratory Journal.* 2022;60(5):2102512. doi:10.1183/13993003.02512-2021
52. Nirschl CJ, Drake CG. Molecular pathways: Coexpression of immune checkpoint molecules: Signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research.* 2013;19(18):4917-4924. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1972
53. Kahan SM, Zajac AJ. Immune exhaustion: Past lessons and new insights from lymphocytic choriomeningitis virus. *Viruses. MDPI AG.* 2019;11(2). doi:10.3390/v11020156
54. Schönrich G, Raftery MJ. The PD-1/PD-L1 Axis and Virus Infections: A Delicate Balance. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:207. doi:10.3389/fcimb.2019.00207
55. Hodgins JJ, Abou-Hamad J, O'Dwyer CE, et al. PD-L1 promotes oncolytic virus infection via a metabolic shift that inhibits the type I IFN pathway. *Journal of Experimental Medicine.* 2024;221(7). doi:10.1084/jem.20221721
56. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 2006;439(7077):682-687. doi:10.1038/nature04444
57. Helble JD, McCarthy JE, Sawden M, Starnbach MN, Hu LT. The PD-1/PD-L1 pathway is induced during *Borrelia burgdorferi* infection and inhibits T cell joint infiltration without compromising bacterial clearance. *PLoS Pathog.* 2022;18(10):e1010903. doi:10.1371/journal.ppat.1010903
58. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(3):153-167. doi:10.1038/nri.2017.108
59. Thakur A, Mikkelsen H, Jungersen G. Intracellular Pathogens: Host Immunity and Microbial Persistence Strategies. *J Immunol Res.* 2019;2019:1-24. doi:10.1155/2019/1356540

60. Ulrichs T, Kaufmann SHE. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol.* 2006;208(2):261-269. doi:10.1002/path.1906
61. Shah KK, Pritt BS, Alexander MP. Histopathologic review of granulomatous inflammation. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis. Elsevier Ltd.* 2017;7:1-12. doi:10.1016/j.jctube.2017.02.001
62. Sawyer AJ, Patrick E, Edwards J, et al. Spatial mapping reveals granuloma diversity and histopathological superstructure in human tuberculosis. *Journal of Experimental Medicine.* 2023;220(6). doi:10.1084/jem.20221392
63. Sakai S, Kauffman KD, Sallin MA, et al. CD4 T Cell-Derived IFN- γ Plays a Minimal Role in Control of Pulmonary Mycobacterium tuberculosis Infection and Must Be Actively Repressed by PD-1 to Prevent Lethal Disease. *PLoS Pathog.* 2016;12(5):e1005667. doi:10.1371/journal.ppat.1005667
64. Kauffman KD, Sakai S, Lora NE, et al. PD-1 blockade exacerbates Mycobacterium tuberculosis infection in rhesus macaques. *Sci Immunol.* 2021;6(55):eabf3861. doi:10.1126/sciimmunol.abf3861
65. Barber DL, Mayer-Barber KD, Feng CG, Sharpe AH, Sher A. CD4 T Cells Promote Rather than Control Tuberculosis in the Absence of PD-1–Mediated Inhibition. *The Journal of Immunology.* 2011;186(3):1598-1607. doi:10.4049/jimmunol.1003304
66. Zeng G, Zhang G, Chen X. Th1 cytokines, true functional signatures for protective immunity against TB? *Cell Mol Immunol.* 2018;15(3):206-215. doi:10.1038/cmi.2017.113
67. Day CL, Abrahams DA, Bunjun R, et al. PD-1 Expression on Mycobacterium tuberculosis-Specific CD4 T Cells Is Associated With Bacterial Load in Human Tuberculosis. *Front Immunol.* 2018;9(August):1-18. doi:10.3389/fimmu.2018.01995
68. Li J, Jin C, Wu C, Huang J. PD-1 modulating Mycobacterium tuberculosis-specific polarized effector memory T cells response in tuberculosis pleurisy. *J Leukoc Biol.* 2019;106(3):733-747. doi:10.1002/JLB.MA1118-450RR
69. Suarez GV, Melucci Ganzarain CDC, Vecchione MB, et al. PD-1/PD-L1 Pathway Modulates Macrophage Susceptibility to Mycobacterium tuberculosis Specific CD8⁺ T cell Induced Death. *Sci Rep.* 2019;9(1):187. doi:10.1038/s41598-018-36403-2
70. Shen L, Gao Y, Liu Y, et al. PD-1/PD-L pathway inhibits M.tb-specific CD4⁺ T-cell functions and phagocytosis of macrophages in active tuberculosis. *Sci Rep.* 2016;6(November):1-9. doi:10.1038/srep38362
71. Tamburini BAJ. Contributions of PD-L1 reverse signaling to dendritic cell trafficking. *FEBS Journal.* 2022;289(20):6256-6266. doi:10.1111/febs.16084

72. Sahler JM, Eade CR, Altier C, March JC. Salmonella enterica Serovar Typhimurium Increases Functional PD-L1 Synergistically with Gamma Interferon in Intestinal Epithelial Cells via Salmonella Pathogenicity Island 2. *Infect Immun*. 2018;86(5):e00674-17. doi:10.1128/IAI.00674-17
73. McCaffrey EF, Donato M, Keren L, et al. The immunoregulatory landscape of human tuberculosis granulomas. *Nat Immunol*. 2022;23(2):318-329. doi:10.1038/s41590-021-01121-x
74. Brom VC, Burger C, Wirtz DC, Schildberg FA. The Role of Immune Checkpoint Molecules on Macrophages in Cancer, Infection, and Autoimmune Pathologies. *Front Immunol*. 2022;13(March):1-15. doi:10.3389/fimmu.2022.837645
75. Hassan SS, Akram M, King EC, Dockrell HM, Cliff JM. PD-1, PD-L1 and PD-L2 Gene Expression on T-Cells and Natural Killer Cells Declines in Conjunction with a Reduction in PD-1 Protein during the Intensive Phase of Tuberculosis Treatment. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137646. doi:10.1371/journal.pone.0137646
76. Hu JF, Zhang W, Zuo W, Tan HQ, Bai W. Inhibition of the PD-1/PD-L1 signaling pathway enhances innate immune response of alveolar macrophages to mycobacterium tuberculosis in mice. *Pulm Pharmacol Ther*. 2020;60:101842. doi:10.1016/j.pupt.2019.101842
77. Singh A, Mohan A, Dey AB, Mitra DK. Inhibiting the programmed death 1 pathway rescues Mycobacterium tuberculosis-specific interferon γ -producing T cells from apoptosis in patients with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*. 2013;208(4):603-615. doi:10.1093/infdis/jit206
78. McNab FW, Berry MPR, Graham CM, et al. Programmed death ligand 1 is over-expressed by neutrophils in the blood of patients with active tuberculosis. *Eur J Immunol*. 2011;41(7):1941-1947. doi:10.1002/eji.201141421
79. Osman M, Ashwin H, Calder G, et al. A conserved grain-associated immunosuppressive niche in Sudanese patients with mycetoma. Preprint posted online April 13, 2026. doi:10.64898/2026.04.09.26350374
80. Magiera-Mularz K, Kocik J, Musielak B, et al. Human and mouse PD-L1: similar molecular structure, but different druggability profiles. *iScience*. 2021;24(1):101960. doi:10.1016/j.isci.2020.101960
81. Zhang L, Chen Y, Li F, Bao L, Liu W. Atezolizumab and Bevacizumab attenuate cisplatin resistant ovarian cancer cells progression synergistically via suppressing epithelial mesenchymal transition. *Front Immunol*. 2019;10(APR):1-14. doi:10.3389/fimmu.2019.00867

82. Li M, Zhao R, Chen J, et al. Next generation of anti-PD-L1 Atezolizumab with enhanced anti-tumor efficacy in vivo. *Sci Rep.* 2021;11(1):1-11. doi:10.1038/s41598-021-85329-9
83. Committee for Medical Products for Human Use (CHMP). *Tecentriq. Procedure No.* EMEA/H/C/004143/0000. Vol 44. 2017. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/004143/WC500235780.pdf
84. Mueller SN, Vanguri VK, Ha S jun, et al. PD-L1 has distinct functions in hematopoietic and nonhematopoietic cells in regulating T cell responses during chronic infection in mice. *J Clin Invest.* 2010;120(7):11-13. doi:10.1172/JCI40040DS1
85. Wurster S, Albert ND, Bharadwaj U, et al. Blockade of the PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Pathway Improves Infection Outcomes and Enhances Fungicidal Host Defense in a Murine Model of Invasive Pulmonary Mucormycosis. *Front Immunol.* 2022;13(February):1-12. doi:10.3389/fimmu.2022.838344
86. Splitt SD, Souza SP, Valentine KM, et al. PD-L1, TIM-3, and CTLA-4 Blockade Fails To Promote Resistance to Secondary Infection with Virulent Strains of *Toxoplasma gondii*. Appleton JA, ed. *Infect Immun.* 2018;86(9):1-16. doi:10.1128/IAI.00459-18
87. Fonseca R, Salgado RM, da Silva HB, do Nascimento RS, D'Império-Lima MR, Alvarez JM. Programmed cell death protein 1-PDL1 interaction prevents heart damage in chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Front Immunol.* 2018;9(MAY). doi:10.3389/fimmu.2018.00997
88. Arana Y, Gálvez RI. Role of the PD-1/PD-L1 Pathway in Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection and Potential Therapeutic Options. *Front Immunol.* 2022;13(June):1-12. doi:10.3389/fimmu.2022.866120
89. Karunaratne DS, Horne-Debets JM, Huang JX, et al. Programmed Death-1 Ligand 2-Mediated Regulation of the PD-L1 to PD-1 Axis Is Essential for Establishing CD4⁺ T Cell Immunity. *Immunity.* 2016;45(2):333-345. doi:10.1016/j.immuni.2016.07.017
90. Zhang Y, Zhou Y, Lou J, et al. PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. *Crit Care.* 2010;14(6):R220. doi:10.1186/cc9354
91. Chen J, Chen R, Huang S, Zu B, Zhang S. Atezolizumab alleviates the immunosuppression induced by PD-L1-positive neutrophils and improves the survival of mice during sepsis. *Mol Med Rep.* 2021;23(2):1-10. doi:10.3892/mmr.2020.11783

92. Lázár-Molnár E, Chen B, Sweeney KA, et al. Programmed death-1 (PD-1)-deficient mice are extraordinarily sensitive to tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(30):13402-13407. doi:10.1073/pnas.1007394107
93. Durward-Diioia M, Harms J, Khan M, Hall C, Smith JA, Splitter GA. CD8+ T cell exhaustion, suppressed gamma interferon production, and delayed memory response induced by chronic *Brucella melitensis* infection. *Infect Immun*. 2015;83(12):4759-4771. doi:10.1128/IAI.01184-15
94. 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;205. doi:10.1016/j.micpath.2025.107697
95. Shrum B, Anantha R V, Xu SX, et al. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC Res Notes*. 2014;7(1):233. doi:10.1186/1756-0500-7-233
96. Ullman-Culleré MH, Foltz CJ. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Lab Anim Sci*. 1999;49(3):319-323. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10403450>
97. Elkington P, Polak ME, Reichmann MT, Leslie A. Understanding the tuberculosis granuloma: the matrix revolutions. *Trends Mol Med*. 2022;28(2):143-154. doi:10.1016/j.molmed.2021.11.004
98. Ma F, Hughes TK, Teles RMB, et al. The cellular architecture of the antimicrobial response network in human leprosy granulomas. *Nat Immunol*. 2021;22(7):839-850. doi:10.1038/s41590-021-00956-8
99. Silva Miranda M, Breiman A, Allain S, Deknuydt F, Altare F. The tuberculous granuloma: An unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? *Clin Dev Immunol*. 2012;2012. doi:10.1155/2012/139127
100. Romano M, Sironi M, Toniatti C, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*. 1997;6(3):315-325. doi:10.1016/s1074-7613(00)80334-9
101. Nishimoto N. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2006;18(3):277-281. doi:10.1097/01.bor.0000218949.19860.d1
102. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2006;8 Suppl 2(Suppl 2):S3. doi:10.1186/ar1917
103. Ibrahim AI, El Hassan AM, Fahal A, van de Sande WW. A Histopathological Exploration of the *Madurella mycetomatis* Grain. *PLoS One*. 2013;8(3). doi:10.1371/journal.pone.0057774

104. Riaz SM, Hanevik K, Sviland L, Mustafa T. Characterization of Early Lesions of Human Post-Primary Tuberculosis and Its Progression to Necrosis Using Archival Material of the Pre-Antibiotic Era. *Pathogens*. 2025;14(3). doi:10.3390/pathogens14030224
105. Meester I, Rosas-Taraco AG, Salinas-Carmona MC. Retnla down-regulation and IL-13-rich environment correlate with inflammation severity in experimental actinomycetoma by *Nocardia brasiliensis*. *Pathog Dis*. 2013;67(3):214-220. doi:10.1111/2049-632X.12036
106. Moussa P, Marton J, Vidal SM, Fodil-Cornu N. Genetic dissection of NK cell responses. *Front Immunol*. 2012;3(JAN). doi:10.3389/fimmu.2012.00425
107. Fukushima A, Yamaguchi T, Ishida W, et al. Genetic background determines susceptibility to experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis: Comparison of Balb/c and C57BL/6 mice. *Exp Eye Res*. 2006;82(2):210-218. doi:10.1016/j.exer.2005.06.010
108. Nasr A, Abushouk A, Hamza A, Siddig E, Fahal AH. Th-1, Th-2 Cytokines Profile among *Mycetomatox* Eumycetoma Patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(7). doi:10.1371/journal.pntd.0004862
109. Huseni MA, Wang L, Klementowicz JE, et al. CD8⁺ T cell-intrinsic IL-6 signaling promotes resistance to anti-PD-L1 immunotherapy. *Cell Rep Med*. 2023;4(1). doi:10.1016/j.xcrm.2022.100878
110. Barley TJ, Murphy PR, Wang X, et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 controls PD-L1 expression by regulating type I interferon during systemic *Escherichia coli* infection. *Journal of Biological Chemistry*. 2022;298(5). doi:10.1016/j.jbc.2022.101938
111. Zhang W, Liu Y, Yan Z, et al. IL-6 promotes PD-L1 expression in monocytes and macrophages by decreasing protein tyrosine phosphatase receptor type O expression in human hepatocellular carcinoma. *J Immunother Cancer*. 2020;8(1). doi:10.1136/jitc-2019-000285
112. Kramer ED, Abrams SI. Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells as Negative Regulators of Anticancer Immunity. *Front Immunol*. 2020;11(August):1-10. doi:10.3389/fimmu.2020.01963
113. Gray EE, Cyster JG. Lymph node macrophages. *J Innate Immun*. 2012;4(5-6):424-436. doi:10.1159/000337007
114. Costa-Madeira JC, Trindade GB, Almeida PHP, Silva JS, Carregaro V. T Lymphocyte Exhaustion During Human and Experimental Visceral Leishmaniasis. *Front Immunol. Frontiers Media S.A.* 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.835711
115. See JX, Chandramathi S, Abdulla MA, Vadivelu J, Shankar EM. Persistent infection due to a small-colony variant of *Burkholderia pseudomallei* leads to

PD-1 upregulation on circulating immune cells and mononuclear infiltration in viscera of experimental BALB/c mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(8):e0005702. doi:10.1371/journal.pntd.0005702

116. Hwang SA, Ali Y, Fedotova E, Hunter RL, Brown RE. Morphoproteomics Identifies the Foamy Alveolar Macrophage as an M2 Phenotype with PD-L1 Expression in the Early Lesion of Post-Primary Tuberculosis: Implications for Host Immune Surveillance and Therapy. *Ann Clin Lab Sci*. 2020;50(4):429-438. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32826237>
117. Rao J, Su R, Peng Y, et al. Low-Density Granulocytes Affect T-SPOT.TB Assay by Inhibiting the Production of Interferon- γ in T Cells via PD-L1/PD-1 Pathway. *Front Microbiol*. 2020;11:622389. doi:10.3389/fmicb.2020.622389
118. Trinath J, Maddur MS, Kaveri S V, Balaji KN, Bayry J. Mycobacterium tuberculosis promotes regulatory T-cell expansion via induction of programmed death-1 ligand 1 (PD-L1, CD274) on dendritic cells. *J Infect Dis*. 2012;205(4):694-696. doi:10.1093/infdis/jir820
119. Piao W, Li L, Saxena V, et al. PD-L1 signaling selectively regulates T cell lymphatic transendothelial migration. *Nat Commun*. 2022;13(1). doi:10.1038/s41467-022-29930-0
120. Wei H, Xie A, Li J, et al. PD-1+ CD4 T cell immune response is mediated by HIF-1 α /NFATc1 pathway after *P. yoelii* infection. *Front Immunol*. 2022;13(August):1-14. doi:10.3389/fimmu.2022.942862
121. Tousif S, Singh Y, Prasad DVR, Sharma P, Van Kaer L, Das G. T cells from Programmed Death-1 deficient mice respond poorly to Mycobacterium tuberculosis infection. *PLoS One*. 2011;6(5):e19864. doi:10.1371/journal.pone.0019864
122. Tang Q, Chen Y, Li X, et al. The role of PD-1/PD-L1 and application of immune-checkpoint inhibitors in human cancers. *Front Immunol*. 2022;13(September):1-19. doi:10.3389/fimmu.2022.964442
123. Lima HR, Gasparoto TH, Malaspina TS de S, et al. Immune checkpoints in leprosy: Immunotherapy as a feasible approach to control disease progression. *Front Immunol*. 2017;8(DEC). doi:10.3389/fimmu.2017.01724
124. Park AJ, Rendini T, Martiniuk F, Levis WR. Leprosy as a model to understand cancer immunosurveillance and T cell anergy. *J Leukoc Biol*. 2016;100(1):47-54. doi:10.1189/jlb.5RU1215-537RR
125. Tarique M, Naz H, Suhail M, et al. Differential expression of programmed death 1 (PD-1) on various immune cells and its role in human leprosy. *Front Immunol*. 2023;14(April):1-10. doi:10.3389/fimmu.2023.1138145

126. Gschwandtner M, Derler R, Midwood KS. More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Front Immunol.* 2019;10:2759. doi:10.3389/fimmu.2019.02759
127. Argentina F, Rusmawardiana, Nopriyati, Putri Laksmi Karim. Extensive Actinomycetoma Clinical Manifestations and Histopathology: A Case Report. *Bioscientia Medicina : Journal of Biomedicine and Translational Research.* 2022;6(15):2705-2712. doi:10.37275/bsm.v6i15.671
128. De Sousa Linhares A, Battin C, Jutz S, et al. Therapeutic PD-L1 antibodies are more effective than PD-1 antibodies in blocking PD-1/PD-L1 signaling. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-9. doi:10.1038/s41598-019-47910-1
129. Wong EA, Evans S, Kraus CR, et al. IL-10 Impairs Local Immune Response in Lung Granulomas and Lymph Nodes during Early Mycobacterium tuberculosis Infection. *J Immunol.* 2020;204(3):644-659. doi:10.4049/jimmunol.1901211
130. Gong JH, Zhang M, Modlin RL, et al. Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. *Infect Immun.* 1996;64(3):913-918. doi:10.1128/iai.64.3.913-918.1996
131. Lin C, Xu G, Gao S, Feng T, Li S. Tuberculosis infection following immune checkpoint inhibitor treatment for advanced cancer: a case report and literature review. *Front Immunol.* 2023;14:1162190. doi:10.3389/fimmu.2023.1162190
132. Bae S, Kim YJ, Kim MJ, et al. Risk of tuberculosis in patients with cancer treated with immune checkpoint inhibitors: a nationwide observational study. *J Immunother Cancer.* 2021;9(9):e002960. doi:10.1136/jitc-2021-002960
133. Barber DL, Sakai S, Kudchadkar RR, et al. Tuberculosis following PD-1 blockade for cancer immunotherapy. *Sci Transl Med.* 2019;11(475):eaat2702. doi:10.1126/scitranslmed.aat2702
134. Anastasopoulou A, Ziogas DC, Samarkos M, Kirkwood JM, Gogas H. Reactivation of tuberculosis in cancer patients following administration of immune checkpoint inhibitors: current evidence and clinical practice recommendations. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):239. doi:10.1186/s40425-019-0717-7
135. Shi J, Li J, Wang Q, et al. The safety and efficacy of immunotherapy with anti-programmed cell death 1 monoclonal antibody for lung cancer complicated with Mycobacterium tuberculosis infection. *Transl Lung Cancer Res.* 2021;10(10):3929-3942. doi:10.21037/tlcr-21-524

13 ANEXO 1. MATERIALES Y REACTIVOS QUÍMICO- BIOLÓGICOS

Modelo biológico e insumos del bioterio

Cepa de ratones: Ratones hembra de la cepa BALB/c. Carl Hansen obtenidos de la Small Animal Section, Veterinary Resources Branch, National Institutes of Health (Bethesda, MD, EE. UU.).

Alimentación experimental: Dieta estandarizada LabDiet 5008 Formulab Diet (Cat. 5008, Purina México S.A. de C.V., México).

Cepa bacteriana: Cepa de referencia de *Nocardia brasiliensis* (Lindenberg) Pinoy, designación de la cepa: HUJEG-1 ATCC 700358.

Fármacos

Atezolizumab: Anticuerpo monoclonal humanizado anti-PD-L1, Tecentriq®, solución de 1200 mg / 20 ml (Roche/Genentech).

Cóctel anestésico: Mezcla inyectable a base de clorhidrato de ketamina 2 mg (Anesket, PISA Agropecuaria, México) y Xilacina 0.4 mg (Procin, PISA Agropecuaria, México).

Reactivos histológicos y de montaje

Hematoxilina: Colorante nuclear catiónico. Hematoxilina de Harris. (Cat. 50296, CTR, México)

Eosina amarillenta alcohólica: Colorante citoplasmático aniónico (Cat. MY.8650-250, Meyer).

Medio de montaje histológico: Resina sintética líquida optimizada para diafanización y sellado óptico. Fisher Chemical Permout (Cat. 15832544, Fisher scientific, España).

Parafina: Parafina purificada para infiltración e inclusión de bloques de tejido. Parafina para histología 56-58°. (Cat. 50904, CTR, México).

Reactivos para ensayos *in vitro* y citometría de flujo

Kit CBA: Para la cuantificación multiplexada de citocinas. BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit (Cat. No. 552364; BD Biosciences, EE. UU.).

CFSE: Diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster. Reactivo CFSE (Cat. 565082, BD Horizon, BD Biosciences, EE. UU.). Alícuotas reconstituidas en DMSO estéril; protegido de la luz a -20 °C.

7-AAD: Solución de tinción de viabilidad BD Pharmingen 7-AAD. (Cat. 51-68981E, Invitrogen, EE. UU.)

Anticuerpos marcados con fluorocromos para citometría de flujo: BD Biosciences, EE. UU.

Tabla 2. Anticuerpos marcados con fluorocromos para citometría de flujo

Panel celular	Proteína blanco	Fluorocromo	Clona
Panel linfoide	CD3	APC-Cy7	17A2
	CD4	Pacific Blue	RM4-5
	CD8 α	V500	53-6.7
	CD279 (PD-1)	PE	J43
Panel mieloide	CD45	BV421	I3/2.3
	Ly6G	APC-Cy7	1A8
	F4/80	AF488	T45-2342
	CD274 (PD-L1)	PE	MIH5

Mitógenos y Estimulantes Clonales: Concanavalina A. Concanavalin A (Cat. C0412, Sigma- Aldrich, Alemania). ConA, stock de 1 mg/ml en PBS estéril.

Gradientes de densidad celular: Ficoll-Paque premium 1.073 g/ml (cat. GE17-5446-52, Merck, Sigma-Aldrich, Alemania).

Sales base: Pastillas para la reconstitución rápida de amortiguador PBS. Amortiguador de fosfato salino. (Cat. P4417-50TAB, Sigma-Aldrich, Alemania). Para 200 ml por tableta.

Estándar de turbidez: Escala de referencia estándar de McFarland.

Material de Consumo e Insumos Desechables

Microtubos: Tubos tipo Eppendorf con capacidad de 1.5 ml. (Cat. 0030120086, Eppendorf, Alemania).

Tubos cónicos: Tubos Falcon de polipropileno de 15 ml y 50 ml (Falcon, Corning, EE. UU.).

Jeringas y Aguja: Jeringas para tuberculina con punta de rosca Luer-Lock / Slip, y agujas hipodérmicas calibre 16 G x 16 mm (Terumo, México).

Filtros de cultivo: Unidades de filtración de membrana con poro de 0.22 μ m Millex GS MF-Millipore MCE Membrane (Cat. SLGSR33SS, Merck, Alemania).

Filtros de ensayo: Membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.45 μm (Cat. HAWP 013 00, Millipore, Merck, S-A, Alemania).

Filtros de tejido: Tamiz celular con poro de 70 μm (Cat. FALO02060, Falcon, Corning, EE. UU.).

Placas de cultivo: Placas de microtitulación de 96 pozos con fondo en U, fabricadas en polipropileno estéril con tapa (Costar® Cat. No. 3790; Corning).

14 ANEXO 2. SOLUCIONES Y AMORTIGUADORES

Amortiguador de Digestión Enzimática Tisular (Concentración 10×): Mezcla constituida por 182.6 mg de Colagenasa (C9891-16; Sigma-Aldrich, EE. UU.) y 62.4 mg de Hialuronidasa (H3506-16; Sigma-Aldrich, EE. UU.), aforados c.s.p. 50 mL de medio MEM-HBS base (Cat. No. 11575032; Gibco, EE. UU.).

Amortiguador PBS libre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1 L): Disolución en agua bidestilada de NaCl 137 mM (8.0 g), KCl 2.7 mM (0.2 g), Na_2HPO_4 10 mM (1.4 g) y KH_2PO_4 1.8 mM (0.2 g). Filtrado a través de membrana de 0.22 μm y almacenado a 4 °C.

Amortiguador Barbitúricos Veronal (1 L): Preparado disolviendo Ácido dietilbarbitúrico (0.4605 g), Dietil barbiturato de sodio (1.0309 g) y NaCl (2.92 g) en agua destilada, agitando constantemente hasta lograr una solución homogénea y aforando a un volumen final de 1000 mL.

Caldo y Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI): Medio BHI estéril en fase líquida y medio sólido Agar BHI preparado a partir de bases comerciales (Cat. No. 241830; BD Difco, EE. UU.).

Medio RPMI Completo (cRPMI): Para un volumen final de 50 mL, se suplementó el medio base RPMI 1640 con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor al 10 % (5 mL), penicilina/estreptomicina al 1 %, L-glutamina 2 mM (0.5 mL de un stock comercial de 200 mM), HEPES 10 mM y piruvato de sodio 1 mM (SLM-240, Sigma-Aldrich, EE. UU.). Se adicionó β -mercaptoetanol 50 μM inmediatamente antes de su uso, filtrando la solución total a través de membranas de 0.22 μm y almacenando a 4 °C.

Solución Concentrada de Lisis de Eritrocitos (Concentración 10×): Formulación a base de NH_4Cl (8.02 g), NaHCO_3 (0.84 g) y EDTA disódico (0.37 g) disueltos c.s.p. 100 mL de agua grado Millipore.

Solución de Geys (1 L): Amortiguador salino para ensayos de quimiotaxis preparado mediante la disolución de NaCl (3.5 g), KCl (1.85 g), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.24 g), K_2HPO_4 (0.119 g), D-Glucosa (5.0 g) y Rojo de fenol (0.05 g) en agua destilada. La solución se aforó a un volumen final de 1 L y se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 15 min.

Solución de Lisis de Eritrocitos ACK (1 L): Preparación manual disolviendo NH_4Cl 150 mM (8.02 g), KHCO_3 10 mM (1.0 g) y EDTA 0.1 mM (0.037 g) en agua bidestilada. El pH se ajustó a un rango estricto de 7.2–7.4 empleando NaOH para clarificar el EDTA. Conservado a temperatura ambiente por un periodo máximo de 6 meses.

Solución Descalcificadora de EDTA al 10% en Tris Base 0.1 M (1 L): Preparación manual disolviendo Tris base 0.1 M (12.11 g) y EDTA disódico dihidratado al 10% p/V (100 g) en agua destilada. El pH se ajustó a un rango estricto de 7.2–7.4 empleando NaOH para lograr la disolución completa del EDTA. Almacenado en refrigeración a 4 °C.

Solución Salina Normal (SSN): Solución estéril de NaCl al 0.9 % de grado clínico (Laboratorios PISA, México).

15 ANEXO 3. EQUIPOS DE LABORATORIO

Citómetro de flujo: Modelo BD LSR Fortessa™ (BD Biosciences, EE. UU.), operado bajo la calibración de voltajes estandarizada para los fluorocromos del panel mieloide y linfoide murino.

Tabla 3. Configuración del citómetro BD LSR Fortessa

Panel celular	Proteína blanco	Fluorocromo	Detector	Voltaje
Viabilidad celular		7-AAD	FSC	258
			SSC	280
			PerCP-Cy5.5	615
Panel linfoide	CD3	APC-Cy7	APC-Cy7	621
	CD4	Pacific Blue	Pacific Blue	477
	CD8 α	V500	AmCyan	472
	CD279 (PD-1)	PE	PE	390
Panel mieloide	CD45	BV421	Pacific Blue	352
	Ly6G	APC-Cy7	APC-Cy7	621
	F4/80	AF488	FITC	469
	CD274 (PD-L1)	PE	PE	390
CBA citocinas	Clasificación de las citocinas Concentración de las citocinas	APC PE	FSC	351
			SSC	240
			APC	380
			PE	360
Proliferación		CFSE	FSC	257
			SSC	263
			FITC	450

Microscopio óptico digital: Estación Motic® RED220 equipada con una cámara integrada Moticam BTU (Motic, China) para la documentación fotográfica de las laminillas.

Incubadora microbiológica: Incubadora J.M. Ortiz (México) calibrada para el crecimiento aerobio de actinomicetos.

Homogeneizador de tejidos: Sistema Potter-Elvehjem de pistón de vidrio para la obtención de suspensiones celulares unicelulares libres de detritos de forma manual.

Dispositivos ópticos de conteo y metrología: Cámara de Neubauer (hemocitómetro estándar), Vernier/calibrador digital, centrífuga de laboratorio y balanza analítica de precisión.

16 ANEXO 4. SOFTWARE

BD FACSDiva™ versión 8.0: Software dedicado para la adquisición automatizada de datos y establecimiento de voltajes/compensaciones de citometría de flujo (BD Biosciences, EE. UU.).

CBA Analysis Software versión 1.1.15: Plataforma informática especializada en la interpolación matemática de curvas estándar para citometría CBA (BD Biosciences, EE. UU.).

Motic Images Plus versión 3.1: Software de análisis óptico digital empleado para la morfometría geométrica computarizada de los granos bacterianos (Motic, China).

ModFit LT™ versión 3.2: Software de modelado estocástico celular para el análisis de los índices de estimulación y división de CFSE (PCBD Cat. 349329).

GraphPad Prism versión 8.0.1: software para el procesamiento estadístico de los datos experimentales y generación de gráficas vectoriales de alta resolución (GraphPad Software Inc., EE. UU.).

17 RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

M.L.H. María Luisa Ruiz de la Cruz

Candidato para el grado de

Doctorado en Ciencias con Orientación en Inmunología

Tesis: Evaluación del efecto del bloqueo de PD-L1 con un anticuerpo monoclonal en un modelo experimental de actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*.

Campo de estudio: Ciencias de la salud.

Biografía: Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 21 de octubre de 1997.

Trayectoria académica: Químico Farmacéutico Biólogo, graduado de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL (2015-2020), con mención honorífica y segundo lugar en su generación. Completó la Maestría Profesionalizante en Laboratorio de Hematología en la Facultad de Medicina de la UANL (2020-2022), donde fue reconocida como Estudiante Distinguido de Posgrado en 2021. Actualmente cursa el Doctorado en Ciencias con Orientación en Inmunología en la misma facultad (2022-2026), con reconocimiento como Estudiante Distinguido de Posgrado en 2025. Su línea de investigación abarca la inmunopatología de infecciones bacterianas crónicas, los mecanismos de evasión inmunológica y la dinámica de biomarcadores en trasplante hematopoyético y en enfermedades hematológicas, de cuya trayectoria, a la fecha, se han derivado un artículo de revisión y cinco artículos originales, publicados en revistas indexadas.