Artículo original
Dermatol Rev Mex 2022; 66 (2): 205-214.

Dermatología
Revista mexicana

https://doi.org/10.24245/dermatolrevmex.v66i2.7625

La infección por *Nocardia brasiliensis* induce la muerte celular de macrófagos

Nocardia brasiliensis *infection induces macrophage cell death.*

Llary Laudith Navarro-Durán,[1,2,5] Atzin Robles-Contreras,[3,4] Laura Estela Castrillón-Rivera,[2] Alejandro Palma-Ramos,[2] Julieta Luna-Herrera,[5] Jorge Ismael Castañeda-Sánchez[2]

Resumen

OBJETIVO: Determinar la muerte celular en macrófagos infectados con *N. brasiliensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS: Estudio experimental efectuado de enero de 2019 a diciembre de 2020, en el que se utilizó la línea celular de macrófagos J774A.1. Se realizaron cinéticas posinfección a 48 horas con *N. brasiliensis* a una MOI de 10:1. En cada tiempo posinfección se realizó la observación de cambios morfológicos por microscopia óptica, se determinó la muerte celular de los macrófagos infectados con tinciones de NA/BrEt y Höechst/IP, asimismo, se realizó la cuantificación de la muerte de los macrófagos utilizando citometría de flujo.

RESULTADOS: Se encontró incremento en la muerte de los macrófagos a medida que aumentó el tiempo posinfección. La cuantificación de la muerte celular en macrófagos sin infectar no demostró cambios importantes. Las tinciones con NA/BrEt y Höechst// IP sugirieron que hubo diferentes formas de muerte celular macrofágica, entre las que destacaron apoptosis y necrosis.

CONCLUSIONES: Los resultados sugieren que los macrófagos infectados por *Nocardia brasiliensis* mueren por apoptosis y necrosis.

PALABRAS CLAVE: Macrófagos; *Nocardia brasiliensis*; actinomicetoma; muerte celular.

Abstract

OBJECTIVE: *To determine cell death in macrophages infected with* N. brasiliensis.

MATERIALS AND METHODS: *An experimental study done from January 2019 to December 2020, in which the J774A.1 macrophage cell line was used. Post-infection kinetics were performed at 48h with* N. brasiliensis *at a MOI of 10:1. At each postinfection time, the observation of morphological changes by optical microscopy was carried out, the determination of the cell death of the infected macrophages was carried out by NA/BrEt and Höechst/IP stains, additionally, quantification of macrophage death was determined by flow cytometry.*

RESULTS: *An increase in macrophage death was found as the postinfection time increased. Quantification of cell death in uninfected macrophages showed no significant changes. NA/BrEt and Höechst/IP stains suggested different forms of cell death, the main were apoptosis and necrosis.*

CONCLUSIONS: *The results suggest that macrophages infected by* Nocardia brasiliensis *die from apoptosis and necrosis.*

KEYWORDS: *Macrophages;* Nocardia brasiliensis*; Actinomycetoma; Cell death.*

[1] Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud.
[2] Laboratorio de Inmunología, Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, México.
[3] Centro de Investigación Biomédica, Hospital Fundación Nuestra Señora de la Luz IAP, Ciudad de México, México.
[4] Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad Simón Bolívar, Ciudad de México, México.
[5] Laboratorio de Inmunoquímica II, Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

Recibido: julio 2021

Aceptado: agosto 2021

Correspondencia
Julieta Luna Herrera
julietalunah@hotmail.com
Jorque I Castañeda Sánchez
jcastanedas@correo.xoc.uam.mx

Este artículo debe citarse como:
Navarro-Durán LL, Robles-Contreras A, Castrillón-Rivera LE, Palma-Ramos A, Luna-Herrera J, Castañeda-Sánchez JI. La infección por *Nocardia brasiliensis* induce la muerte celular de macrófagos. Dermatol Rev Mex 2022; 66 (2): 205-214.

ANTECEDENTES

El micetoma es una enfermedad inflamatoria y crónica de la piel que puede ser causada por actinomicetos (actinomicetoma) o por hongos (eumicetoma), en México y el mundo la especie de actinomicetos más reportada como causante de actinomicetoma es *N. brasiliensis*.[1] La distribución del micetoma en el mundo se da en los países y regiones cercanas al trópico de cáncer.[2] Es una enfermedad crónica de larga duración y se caracteriza por la aparición de lesiones en la piel en forma de nódulos que tienden a producir fístulas, denominados granos.[3] Los granos son estructuras características del micetoma, están formados por microcolonias del agente causal, rodeados de un exopolisacárido, en cortes histológicos de estas lesiones se ha observado abundante presencia de polimorfonucleares neutrófilos; sin embargo, llama la atención la escasa existencia de monocitos/macrófagos.[4]

La respuesta inmunitaria de la piel ante las infecciones se distingue por la producción de efectores como citocinas proinflamatorias y péptidos antimicrobianos, los cuales son producidos por diferentes estirpes celulares, entre las cuales se encuentran las células de Langerhans, linfocitos Tγδ residentes de la piel, neutrófilos y monocitos/macrófagos.[5] Pocos estudios se han realizado para describir la respuesta inmunitaria de la piel a infecciones por actinomicetos.[6] El papel que juegan los monocitos/macrófagos es decisivo para limitar el crecimiento de los microorganismos y el eventual control de los procesos infecciosos;[7] por ello, en las infecciones por actinomicetos debe hacerse hincapié en entender la poca presencia de estas células en el sitio de las lesiones, por lo que este trabajo se centró en la evaluación de la muerte celular en macrófagos infectados por *N. brasiliensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio experimental efectuado de enero de 2019 a diciembre de 2020.

Células

La línea de macrófagos de ratón J774 A.1 fue obtenida de la colección ATCC y cultivados en botellas de 25 cm^2 con medio F-12 (1:1 DME/F-12) [Corning] suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB; Bioproductos) y una solución de penicilina/estreptomicina al 1% (Gibco). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C y atmósfera de CO_2 al 5%.

Bacterias

La cepa de *Nocardia brasiliensis* se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) 3052, que fue cultivada en medio infusión cerebro corazón (BHI) (Becton-Dickinson) a 37°C hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento.

Suspensiones bacterianas

Los cultivos en fase exponencial de *Nocardia brasiliensis* se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 minutos y el sedimento bacteriano (pellet) se resuspendió en solución salina estéril al 0.9%. Se ajustaron las suspensiones del cultivo a una concentración de 300 x 10^6 UFC/mL por método nefelométrico (nefelómetro de McFarland). Para los experimentos se utilizó un índice de multiplicidad de infección (MOI) de 10:1.

Cinética de la infección

Se realizaron monocapas de los macrófagos J774A.1, usando placas de 12 pozos las cuales contenían 100,000 células por pozo. Las células se infectaron con una MOI de 10:1 por dos horas, pasado este tiempo las células fueron tratadas

https://doi.org/10.24245/dermatolrevmex.v66i2.7625

por dos horas con una solución de 80 µg/mL de amikacina (Sigma Aldrich) en medio F-12 (Corning) para la eliminación de las bacterias extracelulares, transcurrido este tiempo, las células se mantuvieron hasta el término de la cinética con medio de cultivo suplementado con 3% de suero fetal bovino y 5 µg/mL de amikacina. Se siguieron tiempos posinfección de 2, 4, 6, 8, 24 y 48 horas.

Cambios morfológicos

Se realizaron monocapas de macrófagos J774A.1 que fueron infectadas como se describió. En cada tiempo posinfección se evaluaron los cambios morfológicos usando un microscopio óptico (Carl-Zeiss).

Tinciones con fluorocromos

Se realizaron monocapas en placas de 12 pozos que contenían cubreobjetos estériles, se realizó la cinética de infección con una MOI 10:1 como se describió. Para cada tiempo posinfección se retiró el medio de mantenimiento y se lavó cada pozo con PBS 1X tres veces, en cinéticas por separado se adicionaron dos mezclas de fluorocromos: *a)* naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BrEt: 100 µg/mL:100 µg/mL) y *b)* Hoechst/ioduro de propidio (Höechst/IP: 0.5 mg/mL:1 mg/mL). Las células con los colorantes se incubaron durante 15 minutos en completa oscuridad, posteriormente se realizaron tres lavados con PBS 1X, los cubreobjetos fueron recuperados y montados en portaobjetos usando como medio de montaje VectaShield (VectorLabs Inc). Finalmente, las laminillas se observaron con ayuda de un microscopio de fluorescencia (Carl-Zeiss).

Tinción con ioduro de propidio

Se realizaron cultivos de macrófagos J774.A1 en placas de 12 pozos que contenían 250,000 células/pozo, la cinética de infección se realizó como se describió. Para cada tiempo posinfección las células adherentes se recuperaron por raspado en microtubos de 1.5 mL. Las muestras obtenidas de cada tiempo posinfección se centrifugaron y posteriormente se lavaron con PBS 1X, después se resuspendieron en 20 µL de una solución de ioduro de propidio (IP, 1 mg/mL) y se incubaron durante 10 minutos a 37°C en oscuridad. Por último, se fijaron a 4°C en una solución de paraformaldehído (Sigma-Aldrich) al 0.4% para su posterior lectura en el citómetro de flujo (BD FACS CANTO II) utilizando el láser rojo (633 nm). Los resultados se analizaron en un diagrama de puntos donde el eje X representó el canal ioduro de propidio (intensidad de fluorescencia) y el eje Y representado por SSC-A (complejidad o granulosidad celular).

Análisis estadístico

Los valores absolutos de células muertas cuantificadas por citometría de flujo se analizaron por medio de la prueba de t de Student para muestras relacionadas; un valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. La prueba se realizó con el programa GraphPad Prism versión 9.

RESULTADOS

Los macrófagos infectados con *N. brasiliensis* a una MOI 10:1 se observaron con cambios morfológicos importantes desde las dos horas después de la infección. Entre los cambios observados se encontró la alteración de la morfología celular. Las células sin infectar (control) mostraron una forma fusiforme, por microscopia óptica se detectaron células refringentes con ligeras proyecciones apicales; sin embargo, desde las 2 horas posinfección con *N. brasiliensis* se observaron los cambios en el tamaño, forma y disminución de las proyecciones celulares, posteriormente entre 4 y 10 horas se observó una deformación importante en las células, muchas de ellas se observaron de menor tamaño. En el periodo de 24 a 48 horas posinfección la muer-

te celular fue evidente, con disminución en el número de células y la destrucción de las monocapas; en las 48 horas posinfección también se observaron abundantes restos celulares. **Figura 1**

Para comprobar la muerte de los macrófagos infectados con *N. brasiliensis*, se realizaron tinciones con colorantes específicos. Los macrófagos sin infectar se observaron principalmente de color verde, con la tinción de naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BrEt), este color indicó que las células se encontraban vivas. Con esta misma tinción, se observaron pocas células muertas en los cultivos con 2 y 4 horas posinfección; sin embargo, a pesar de que el número de células muertas fue mínimo, pudo determinarse muerte por necrosis, evidenciada por la coloración naranja que mostraban las células (**Figura 2**). Entre 6 y 8 horas posinfección se observó una cantidad importante de macrófagos con tonalidad amarilla, lo que sugirió la existencia de células con muerte por apoptosis temprana. A partir de 10 y 12 horas se observaron diferentes tipos de muerte celular: apoptosis temprana, tardía y necrosis, lo que quedó de manifiesto por las diferentes coloraciones mostradas por las células infectadas. Por último, se observó que entre 24 y 48 horas posinfección hubo una reducción importante en el número de células en las monocapas de macrófagos, lo que indica alto grado de muerte y destrucción celular. **Figura 2**

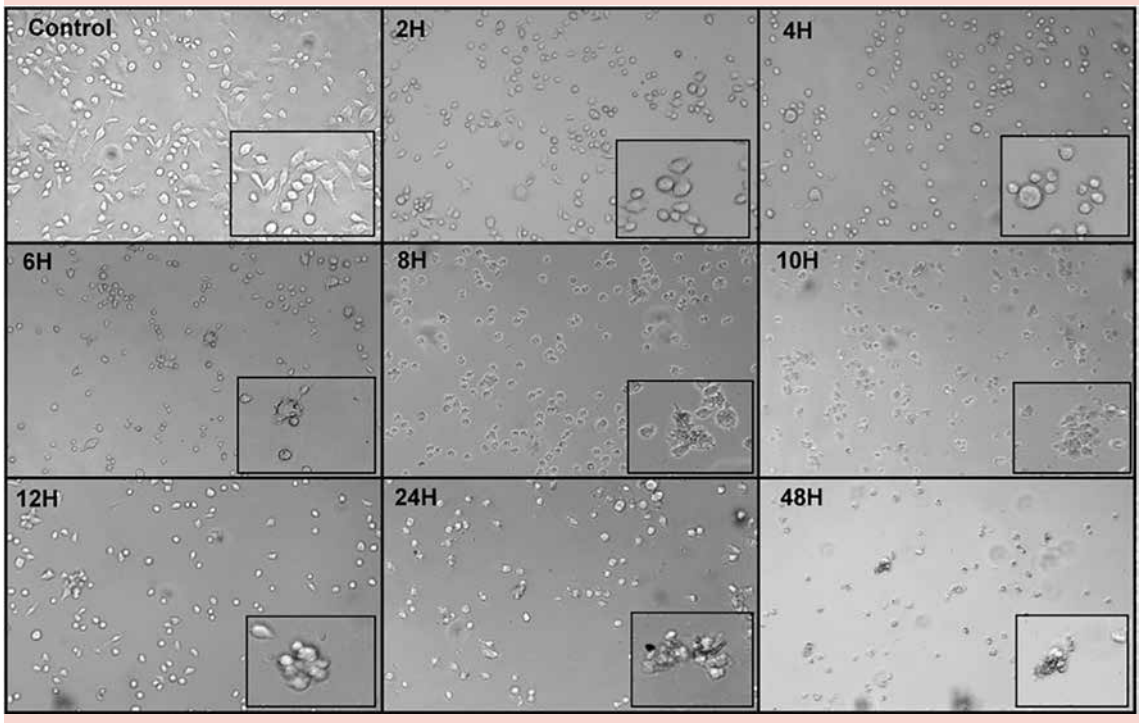

Figura 1. Cambios morfológicos de macrófagos infectados con *N. brasiliensis*. Los macrófagos J774A.1 fueron infectados con una MOI 10:1 de *N. brasiliensis* CECT 3052. Cinética a 48 horas de la infección. Microscopia óptica, aumento 20X. En la imagen se observan cambios en morfología y tamaño de las células infectadas a lo largo de la cinética posinfección.

https://doi.org/10.24245/dermatolrevmex.v66i2.7625

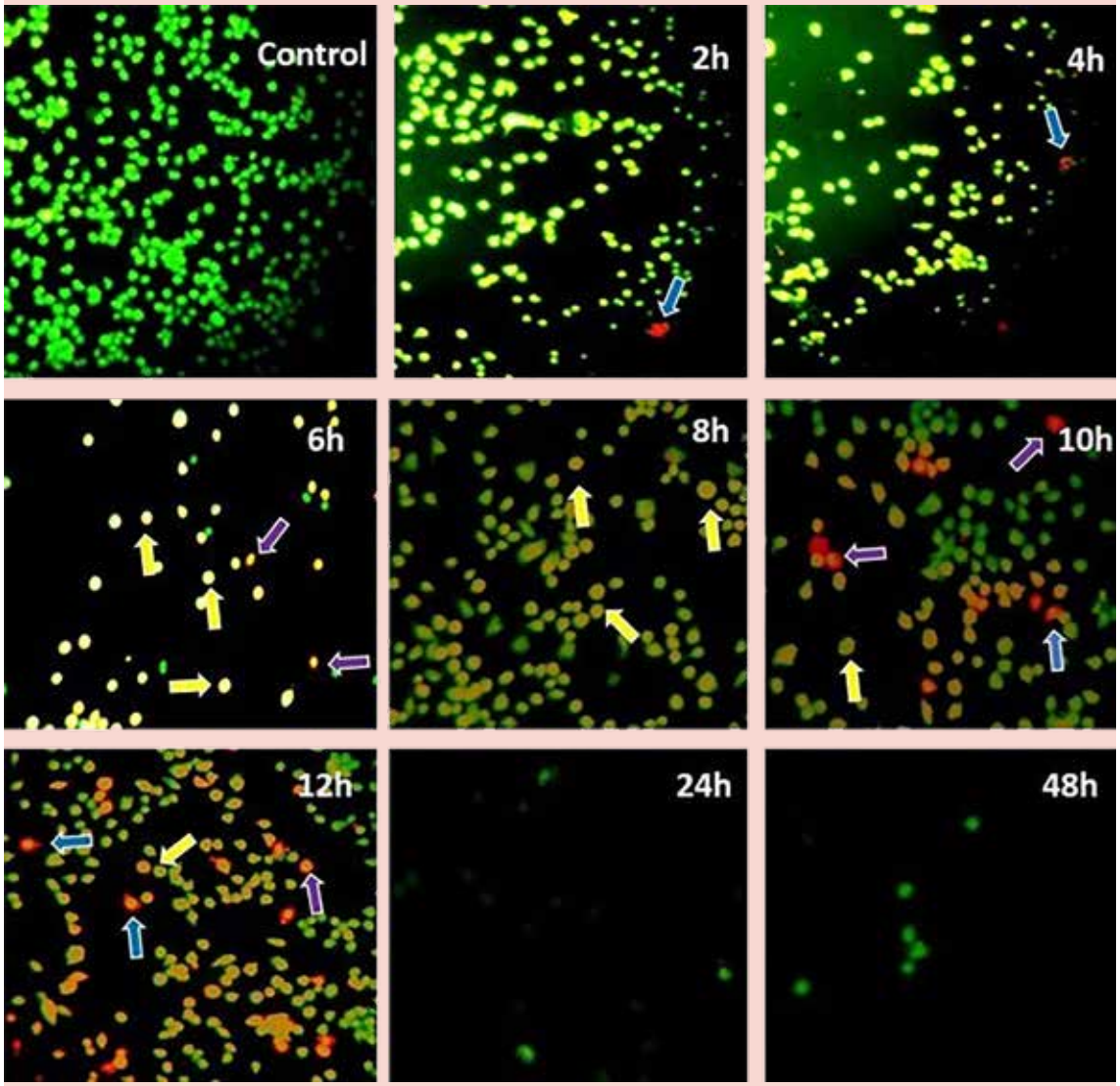

Figura 2. Evaluación de la muerte celular en macrófagos infectados con *N. brasiliensis* (tinción de NA7BrEt). Los macrófagos J774A.1 fueron infectados con la cepa de referencia CECT 3052 de *N. brasiliensis* a una MOI 10:1. Cinética posinfección a 48 horas. Las células se tiñeron en cada tiempo posinfección con NA/BrEt. Las células vivas se tiñen de verde, las células con muerte celular se tiñen de naranja/rojo. La coloración amarilla indica apoptosis temprana (flecha amarilla), la coloración amarilla/naranja con integridad nuclear sugiere muerte por apoptosis tardía (flecha morada) y la coloración naranja con alteración de la integridad nuclear indica necrosis (flecha azul). Aumento 40X.

En concordancia con los resultados de la tinción de NA/BrEt, los macrófagos infectados y teñidos con la mezcla de Höechst/IP mostraron un alto nivel de muerte celular derivado de la infección por *N. brasiliensis*.

El colorante Höechst tiñe núcleos en color azul y el colorante IP tiñe los núcleos de color rojo en las células donde se ha perdido la integridad de la membrana nuclear.

Las células sin infectar mostraron una coloración azul únicamente, lo que indica que las células estaban viables. Los macrófagos infectados con *N. brasiliensis* a las 3 h de la infección mostraron nivel bajo de muerte celular, que se incrementó con el paso del tiempo posinfección. Entre 6 y 13 horas después de la infección se observó aumento en el número de células de color rojo, señalando el daño en la integridad de la membrana nuclear, indicativo de muerte celular. Por último, y en el mismo sentido que los resultados obtenidos con la tinción de NA/BrEt, aunado a los cambios morfológicos observados por microscopia óptica, se observó que entre 24 y 48 horas posinfección hubo evidente disminución del número de células que formaban parte del monocapa celular. **Figura 3**

Después de realizar los ensayos con tinciones específicas, se procedió a realizar la cuantificación de la muerte celular en los macrófagos infectados con *N. brasiliensis* a una MOI 10:1 mediante citometría de flujo. Los resultados demostraron que los macrófagos sin infectar (control) mostraron un porcentaje de muerte celular menor al 1%. Posteriormente en la cuantificación de la muerte celular en los tiempos posinfección se observó tendencia hacia el aumento de células muertas; a las 2 horas el porcentaje fue del 2%, a las 4 horas fue del 3.7% y la tendencia fue al alza hasta alcanzar valores de muerte celular del 52.7% a las 24 horas (**Figura 4A**). De manera adicional se realizó la cuantificación en números absolutos de los macrófagos muertos por la infección de *N. brasiliensis* a lo largo de la cinética de infección y en concordancia con los resultados anteriores se observó que mientras más horas postinfección pasen, la cantidad de macrófagos muertos fue mayor, desde las 6 y hasta las 24 horas posinfección este aumento en la muerte celular fue estadísticamente significativo. **Figura 4B**

DISCUSIÓN

El micetoma es una infección de la piel, tejido celular subcutáneo o hueso, causada por hongos (eumicetoma) y bacterias del grupo de los actinomicetos (actinomicetoma), en América México y Brasil son los países con mayor grado de incidencia.[1,2,8,9]

Dentro del grupo de los actinomicetos causantes de esta infección están los géneros *Nocardia* y *Actinomadura*.[8] En 2016 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró al micetoma como una enfermedad desatendida y a pesar de los esfuerzos por entender por completo la patogénesis de la enfermedad en piel, no quedan del todo claro los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria y el establecimiento en algunos casos de una infección de tipo crónica.[3,10,11]

Las lesiones en la piel que ocurren en los pacientes con actinomicetoma se caracterizan por ser de tipo inflamatorio y crónico; a medida que evolucionan se desarrollan estructuras denominadas granos, los cuales contienen microcolonias del agente causal.[3] En cortes histológicos de biopsias de pacientes con actinomicetoma se observa que estas estructuras están rodeadas de un exopolisacárido y también alrededor se observa importante acumulación celular conformada principalmente por neutrófilos y, en menor cantidad, eosinófilos y linfocitos. En una zona más distal del grano, se encuentran células

https://doi.org/10.24245/dermatolrevmex.v66i2.7625

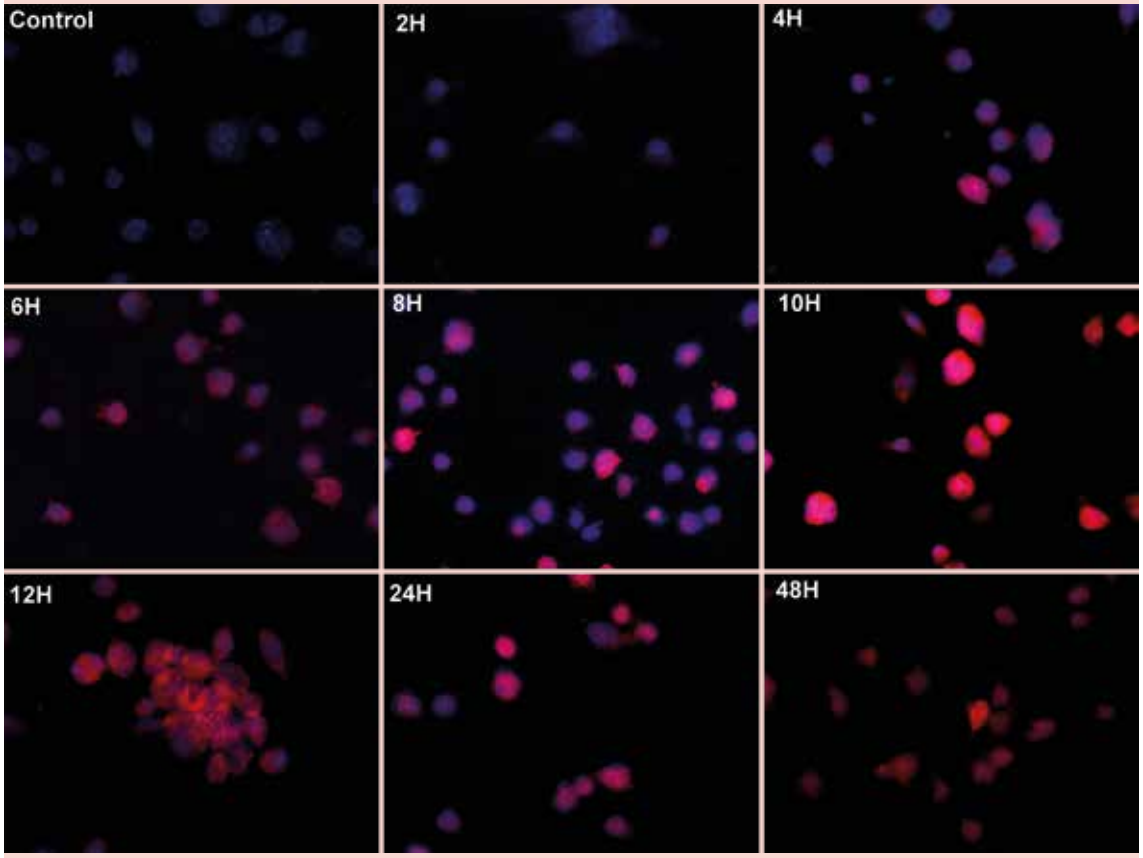

Figura 3. Muerte celular de macrófagos infectados con *N. brasiliensis*. Los macrófagos J774A.1 se infectaron con la cepa de referencia CECT 3052 de *N. brasiliensis* a una MOI 10:1. Cinética a las 48 horas de la infección. Las células se tiñeron en cada tiempo posinfección con Höechst/IP. Las células vivas se tiñen de azul, las células con muerte celular se tiñen de rojo. Aumento 40X.

epiteloides, células gigantes multinucleadas y bajo conteo de monocitos/macrófagos.[4]

Una de las estirpes celulares más estudiadas en el control de las infecciones son los macrófagos, que activan diversos mecanismos para el control de los patógenos; en el caso de la tuberculosis –causada por un miembro de la familia de los actinomicetos– los macrófagos juegan un papel esencial en el control de la enfermedad.[12,13]

Son varios los trabajos que han señalado los escasos monocitos/macrófagos en las lesiones de actinomicetoma en humanos,[14] ante estas observaciones, el objetivo de este trabajo fue establecer si *N. brasiliensis* era capaz de inducir la muerte en esta estirpe celular en diferentes tiempos posinfección. Una línea celular de macrófagos murinos se utilizó en este estudio, existen diversos reportes de la utilización del modelo de ratón para el estudio de la patogénesis del actinomicetoma.[15,16,17]

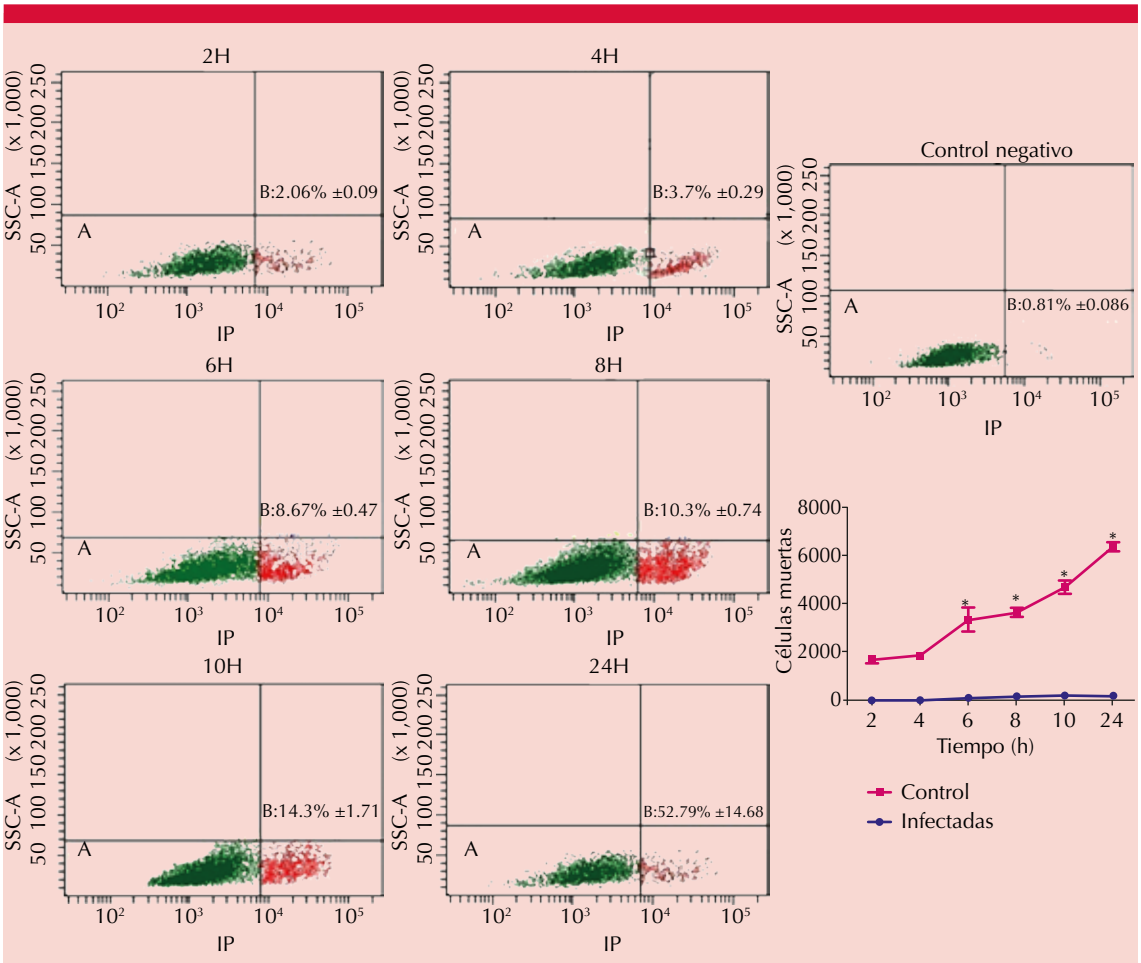

Figura 4. Cuantificación de la muerte celular de macrófagos infectados con *N. brasiliensis*. Los macrófagos J774A.1 se infectaron con la cepa de referencia CECT 3052 de *N. brasiliensis* a una MOI 10:1. Cinética a las 48 horas. Las células se tiñeron en cada tiempo posinfección con IP. **A.** Plots de citometría de flujo. **B.** Cuantificación de la muerte celular.
* $p < 0.05$.

Los datos experimentales obtenidos en esta investigación demostraron que, una vez que se infectaron los macrófagos con *N. brasiliensis*, las células experimentaron cambios importantes en su morfología, por ejemplo, cambios en el tamaño y morfología celular, deformación de la membrana celular, en algunos casos se observó la alteración en las proyecciones de la membrana, entre otros. Cambios similares a los observados en la infección de macrófagos por *N. brasiliensis* se han observado en otros modelos infecciosos, como el caso de la infección por *M. tuberculosis* en la que los macrófagos que entran en contacto con los microorganismos desencadenan diversos mecanismos de fagocitosis y destrucción de patógenos, resultando en la muerte de esta estirpe celular.[18] En nuestro caso, 24 horas después de la infección se observaron restos celulares, lo que evidencia un posible proceso de muerte celular.

https://doi.org/10.24245/dermatolrevmex.v66i2.7625

Diversos autores han demostrado que los macrófagos infectados con microorganismos pueden morir por diferentes vías, entre las que se reconoce la apoptosis, necrosis, xenofagia, NETosis, piroptosis y otras.[19]

La utilización en este estudio de diversas combinaciones de colorantes que se intercalan en el ADN de las células permitió reconocer que algunos macrófagos infectados con *N. brasiliensis* en etapas tempranas mueren por apoptosis (6 horas posinfección); sin embargo, 24 horas después de la infección se identifican células que mueren por apoptosis, pero también por necrosis. Si bien no existen reportes de la capacidad que pudiera tener *N. brasiliensis* de inducir la muerte celular de los macrófagos, existen algunos reportes del efecto de algunos lípidos de la pared de este microorganismo, que son capaces de modular la respuesta de esta estirpe celular, así como favorecer el establecimiento de un proceso claramente inflamatorio, lo que pudiera conllevar en etapas tardías de la infección a la muerte de los macrófagos.[20]

Existen pocos reportes de la determinación de la presencia de estas células esenciales en el control del micetoma, algunos de ellos identifican la existencia de células espumosas o macrófagos espumosos en las lesiones; sin embargo, su presencia se ha señalado en la zona más distal del grano; se ha descrito que estas células espumosas son productoras de mediadores de la respuesta inmunitaria de la piel, produciendo citocinas fundamentalmente proinflamatorias[16] que pueden ser responsables de afluencia celular constante al sitio de infección y contribuir así a la cronicidad de la lesión.

En este estudio, en el modelo de infección macrófago-*Nocardia* que se utilizó, el índice de multiplicidad de infección (MOI) fue alto, considerando que simula, de alguna manera, las condiciones *in vivo*, en las que los macrófagos que rodean de forma inmediata al "grano se confrontarán con abundantes bacterias y, de acuerdo con nuestros resultados, este tipo de interacción promueve la muerte celular. Otros estudios de infección macrofágica por *Nocardia* se han realizado con menores índices de infección y probablemente por esta razón, el evento de muerte celular inducido por este microorganismo no pudo observarse.[14,16]

Por último, nuestros resultados de cuantificación de la muerte celular de macrófagos infectados con *N. brasiliensis* mediante citometría de flujo reflejan que a medida que aumenta el tiempo posinfección, se incrementa el porcentaje de células muertas, definitivamente estos hallazgos son parte de uno de los primeros reportes que demuestran que *N. brasiliensis* induce la muerte de macrófagos infectados y que, además, sugieren que este evento puede ser por apoptosis y por necrosis.

CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que *Nocardia brasiliensis* induce la muerte de los macrófagos infectados, esta muerte celular ocurre en mayor medida como necrosis y apoptosis.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto CB-2015-258735 y del Proyecto SIP20210051.

LILND es estudiante del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM y becaria del CONACyT. JLH y JICS son miembros del SNI. JICS, ALP y LECR son profesores con perfil PRODEP. JLH es becaria COFAA y EDI, del Instituto Politécnico Nacional.

REFERENCIAS

1. Arenas R, Fernandez Martinez RF, Torres-Guerrero E, Garcia C. Actinomycetoma: an update on diagnosis and treatment. Cutis 2017; 99 (2): E11-E15.
2. Emery D & Denning DW. The global distribution of actinomycetoma and eumycetoma. PLoS Negl Trop Dis 2020; 14 (9): e0008397. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008397.
3. Verma P y Jha A. Mycetoma: reviewing a neglected disease. Clin Exp Dermatol 2019; 44 (2): 123-129. DOI: 10.1111/ced.13642.
4. Palma-Ramos A, Castrillón-Rivera L, Padilla-Desgarennes C, Rosas-Hernández LIL, Márquez C. Purificación y determinación de la estructura de los polisacáridos que forman el cemento de unión en granos de actinomicetomas ocasionados por *Actinomadura madurae* y *Nocardia brasiliensis*. Dermatología Rev Mex 2006; 50: 167-73.
5. Matejuk A. Skin immunity. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2018; 66 (1): 45-54. DO: 10.1007/s00005-017-0477-3.
6. Santiago-Téllez A, Castrillón-Rivera LE, Palma-Ramos A, Bello-López JM, Sainz-Espuñes T, Contreras-Paredes A, Luna-Herrera J, Castañeda-Sánchez JI. Keratinocyte infection by *Actinomadura madurae* triggers an inflammatory response. Trans R Soc Trop Med Hyg 2019; 113 (7): 392-398. DOI: 10.1093/trstmh/trz022.
7. Oishi Y & Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. Int Immunol 2018; 30 (11): 511-528. DOI: 10.1093/intimm/dxy054.
8. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Bonifaz A, Arenas R, Mayorga J, et al. Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos. Gac Med Mex 2013; 149: 586-92.
9. Emery D y Denning DW. The global distribution of actinomycetoma and eumycetoma. PLoS Negl Trop Dis 2020; 14 (9): e0008397. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008397.
10. WHO. 66th World Health Assembly, Neglected Tropical Diseases List.Geneva: World Health Organization, 2016. https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases.
11. Zijlstra EE, van de Sande WWJ, Welsh O, Mahgoub ES, Goodfellow M, Fahal AH. Mycetoma: a unique neglected tropical disease. Lancet Infect Dis. 2016; 16 (1): 100-112. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00359-X.
12. Terziroli Beretta-Piccoli B, Mainetti C, Peeters MA, Laffitte E. Cutaneous granulomatosis: A comprehensive review. Clin Rev Allergy Immunol 2018; 54 (1): 131-146. DOI: 10.1007/s12016-017-8666-8.
13. von Stebut E. Was ist ein Granulom? [What is a granuloma?]. Hautarzt 2017; 68 (7): 520-525. DOI: 10.1007/s00105-017-4000-x.
14. Guimarães CC, Castro LG, Sotto MN. Lymphocyte subsets, macrophages and Langerhans cells in actinomycetoma and eumycetoma tissue reaction. Acta Trop 2003; 87 (3): 377-84. DOI: 10.1016/s0001-706x(03)00139-6.
15. García-Lozano JA, García-Berlanga CC, Viveros-Rosado RT, Ocampo-Candiani J, Vargas-Villarreal J, Vera-Cabrera L. A novel experimental immunomodulatory therapy against *Nocardia brasiliensis* in a BALB/c murine model. Clin Exp Dermatol 2020; 45 (5): 544-548. DOI. 10.1111/ced.14139.
16. 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.
17. Palma Ramos A, Castrillón Rivera LE, Elija Sánchez JJ, Padilla DesgarennesC, Heuze IJY. Infección experimental por *Actinomadura madurae* en ratón. Rev Cent Dermatol Pascua 2000; 9 (2): 96-101.
18. Zhang L, Jiang X, Pfau D, Ling Y, Nathan CF. Type I interferon signaling mediates *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage death J Exp Med 2021; 218 (2): e20200887. DOI: 10.1084/jem.20200887.
19. Nirmala JG, Lopus M. Cell death mechanisms in eukaryotes. Cell Biol Toxicol 2020; 36 (2): 145-164. DO:. 10.1007/s10565-019-09496-2.
20. 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): 3587-601. DOI: 10.1128/IAI.00446-12.

https://doi.org/10.24245/dermatolrevmex.v66i2.7625