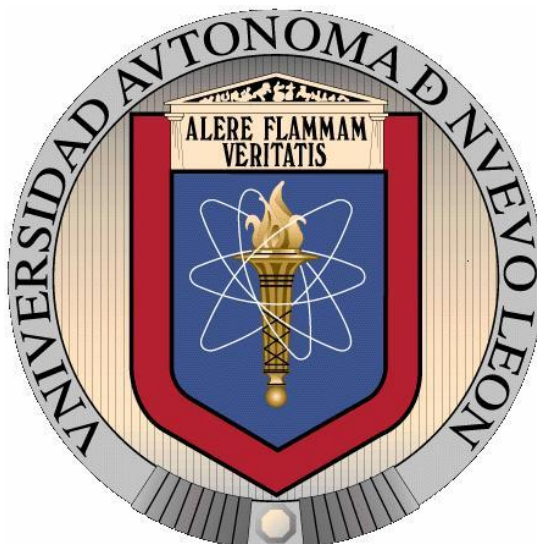


HOSPITAL UNIVERSITARIO “Dr. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ”

SERVICIO DE DERMATOLOGÍA



“Actividad in vitro, ex vivo, e in vivo de una nueva oxazolidinona

DA-7157 sobre *Nocardia brasiliensis*”

Por

MCP Nelly Alejandra Espinoza González

Como requisito parcial para optar al grado de Doctor en Medicina con Especialidad

en Dermatología

Enero 2011

“Actividad in vitro, ex vivo, e in vivo de una nueva oxazolidinona,
DA-7157, sobre *Nocardia brasiliensis*”

Aprobación de la Tesis:

Dr. Lucio Vera Cabrera
Director de Tesis

Dr. Oliverio Welsh Lozano
Co- Director de Tesis

Dr. Jorge Ocampo Candiani
Co-Director de Tesis

Dra. Sc. Noemí Waksman de Torres

Dr. Mario César Salinas Carmona

Dr. Jorge Castro Garza

Dr. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

Primeramente gloria y honra a Dios por su bendición, provisión, guía y cuidado. Quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento y admiración al Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera, asesor de mi tesis y guía en este proyecto, al Dr. Med. Oliverio Welsh Lozano y al Dr. Jorge Ocampo Candiani, asesores de esta tesis, a la Dra. Sc. Noemí Waksman de Torres, al Dr. Sc. Mario César Salinas Carmona y al Dr. Jorge Castro Garza, por formar parte del comité de tesis.

A mis maestros en la residencia, Dr. Jaramillo, Dra. Gómez, Dr. Velázquez, Dr. González, Dra. Liy y Dra. Herz, por su valioso apoyo y comprensión.

Al personal del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS, en especial al MVZ Gerardo Lozano Garza por su invaluable apoyo e irremplazable ayuda durante el desarrollo de este trabajo y al Dr. Salvador Said por las atenciones y facilidades para realizar este trabajo en sus instalaciones.

Al personal del laboratorio Interdisciplinario de Dermatología, Dra. Carmen Molina y las químicas Wendy Escalante, Paola Rivera, Evangelina González y Anabel Gallardo por su ayuda y apoyo.

A mi esposo, Ricardo por su amor, apoyo incondicional y comprensión durante todo el tiempo. A mis padres: Luis y Nelly, quienes han sido mi guía, mi motivación, mi fuente de aliento y ánimo, quienes se desvelaban, madrugaban y acompañaban en todo momento y se volvieron expertos en el manejo de ratones. A mis hermanas Ana y Gaby, cómplices y amigas, mejores apoyo no hay y mi cuñado Luis. A mis abuelitos: Remigio y Angelina, ejemplo de tenacidad, constancia y amor. A mi abuelita Juanita, que aunque no esté más aquí, sus enseñanzas y consejos me hacen ser quien ahora soy. A mis suegros, Arcadio y Cony, a mis tíos, tías y primos por su apoyo y confianza.

A mis compañeros y amigos en la residencia Betty, Bárbara, Alejandra, Ericka, Tere, Alma, Claudia, Brenda, Mayra, Osvaldo, Roger y Dan. Además de agradecer al personal administrativo del servicio de Dermatología y a todos los que directa o indirectamente estuvieron involucrados en este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. EPIDEMIOLOGÍA.....	10
3. PATOGENIA.....	13
4. TRATAMIENTO.....	17
5. IMPORTANCIA.....	27
6. ORIGINALIDAD.....	28
7. JUSTIFICACIÓN.....	29
8. HIPÓTESIS.....	30
9. OBJETIVO GENERAL.....	31
10. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
11. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
12. RESULTADOS.....	49
13. DISCUSIÓN.....	78
14. CONCLUSIONES.....	90
15. REFERENCIAS.....	91

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Concentración mínima inhibitoria de linezolid, DA-7157 y DA-7218 obtenida a las 48hrs.....	49
2. Relación de la cuenta de sobrenadante-fondo de ensayo de infección de monocapa de macrófagos con <i>N. brasiliensis</i> , relación 1:1.....	50
3. Relación de la cuenta de sobrenadante-fondo de ensayo de infección de monocapa de macrófagos con <i>N. brasiliensis</i> , relación 3:1.....	51
4. Evaluación estadística empleando la prueba de Dunnet de 2 lados, comparación múltiple con control.....	62
5. Evaluación estadística empleando la prueba de Dunnet con intervalos de confianza simultáneos para tratamiento vs control negativo.....	63
6. Evaluación estadística empleando la prueba de Dunnet con intervalos de confianza simultáneos para tratamiento vs control positivo.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química de linezolid.....	21
2. Estructura química de DA-7157.....	23
3. Estructura química de DA-7218.....	24
4. Suspensión bacteriana de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1(ATCC 700358) empleada para infectar la monocapa de macrófagos.....	52
5. Infección de monocapa de macrófagos THP-1 con la suspensión unicelular de <i>N. brasiliensis</i> . a) 1hr b) 6 hrs.....	53
6. Infección de monocapa de macrófagos THP-1 con la suspensión unicelular de <i>N. brasiliensis</i> . a) 12hrs b)24hrs.....	54
7. Infección de monocapa de macrófagos THP-1 con la suspensión unicelular de <i>N. brasiliensis</i> .a)48hrs b)12 hrs.....	55
8. Cuantificación de células de <i>N. brasiliensis</i> con Azul alamar por fluorescencia..	56
9. Gráfica de cuantificación de sobrenadante y fondo del ensayo de infección de <i>N. brasiliensis</i> en monocapa de macrófagos THP-1 (3:1).....	57
10. Concentración de <i>N. brasiliensis</i> en monocapa de macrófagos THP-1+ oxazolidinonas. Evaluación por el método fluorométrico con azul alamar.....	59
11. Evaluación con prueba de Kruskal-Wallis ANOVA de una vía.....	61

12. Concentración plasmática de DA-7218 en ratones BALB/c.....	66
13. Concentración plasmática de DA-7157 en ratones BALB/c	67
14. Concentración plasmática de oxazolidinonas en ratones BALB/c.....	68
15. Escala para medición de lesiones producidas por <i>N. brasiliensis</i> en el modelo experimental murino.....	70
16. Evaluación al final del 1er ciclo de ensayo, 1er ensayo en ratones BALB/c.....	71
17. Evaluación final del 2do ciclo de ensayo, 1er ensayo en ratones BALB/c.....	72
18. Gráfica en cajas (boxplot) del 1er ensayo terapéutico. Prueba de Dunnet.....	73
19. Evaluación al final del 1er ciclo del tratamiento combinado de DA-7218 + SXT, en ratones BALB/c.....	74
20. Evaluación al final del 2do del tratamiento combinado de DA-7218 + SXT, en ratones BALB/c.....	76
21. Gráfica en cajas (boxplot) de los resultados al final del tratamiento combinado de DA-7218 + SXT, en ratones BALB/c. Prueba de Dunnet.....	77

INTRODUCCIÓN

El micetoma es una enfermedad granulomatosa crónica de etiología múltiple que afecta piel, tejido celular subcutáneo, huesos y órganos sólidos. Se caracteriza por la tríada de tumefacción sólida en el sitio afectado, la formación de abscesos cavitarios y la presencia de gránulos o micro-colonias del agente etiológico en la secreción sero-purulenta (28, 63, 94, 97). Se presenta principalmente en regiones geográficas intertropicales, teniendo cierta predilección por aquellos países entre las latitudes 15°S y 30°N (44).

Fue descrita por primera vez en 1842, en Madura, India por Gill nombrada originalmente como Pie de Madura (28,48). Fue hasta 1860 que Carter asumiendo su origen fúngico la nombró micetoma o Tumor de Hongos. En 1913, Pinoy separó los micetomas producidos por hongos verdaderos (eumicetomas) de aquellos producidos por actinomicetos (actinomicetomas), siendo estos últimos los más frecuentes (1,10,28,97).

EPIDEMIOLOGÍA

El micetoma predomina en el sexo masculino en una proporción de 5:1 para todos los agentes causales excepto para *Actinomadura madurae* donde la relación es 2:3. Es más frecuente entre la segunda y cuarta década de la vida, aunque se han reportado casos en los extremos de la vida. El hecho de comprometer más hombres que mujeres puede ser explicado por el trabajo en el campo, lo cual favorece la exposición a los agentes causales. Los agentes infecciosos se introducen a la piel a través de traumatismos menores originados con astillas de madera o de algún otro material que contenga los microorganismos, éstos generalmente habitan en la tierra. La enfermedad afecta principalmente los pies (70%) seguida por piernas y manos (28, 39, 42, 48-49, 70, 77, 80, 92-94, 97).

Se considera que el micetoma es una enfermedad con distribución mundial, endémica en regiones tropicales, subtropicales y templadas. México, Venezuela, Sudan, India, Pakistán, Senegal, y Somalia tienen la incidencia más alta (1, 24, 28, 42, 44, 48-49, 70). A nivel mundial 60% de los casos son causados por actinomicetos y un 40% por eumicetos. Los países donde la incidencia de micetomas es mayor son relativamente áridos, con estaciones lluviosas durante 4 a 6 meses por año y con humedad relativa de aire oscilando entre 60 y 80% y temperaturas entre 30 y 37°C (28, 39, 46, 66). Los micetomas son endémicos particularmente en India

(49), Sudan (1), Senegal (26), Somalia (24), Venezuela (70), Brasil (74) y México (46).

Los agentes causales de actinomicetomas se agrupan en tres géneros con diferentes especies: *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia asteroides*, *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri* y *Streptomyces somaliensis*. Los agentes causales más frecuentes del eumicetoma son: *Madurella mycetomatis*, *Madurella grisea* y *Pseudallescheria boydii* (28, 39, 46, 92, 97).

Los agentes causales de micetoma varían dependiendo del país y regiones. En México, el 98% del total de los casos de micetoma son causados por actinomicetos, siendo *Nocardia brasiliensis* el más frecuentemente aislado, ocupando el 86% de los casos seguido por *Actinomadura madurae* en un 10.2 % y otros actinomicetos (46, 63, 94, 97).

En los países africanos los agentes más comúnmente aislados son: *Madurella mycetomatis*, *Streptomyces somaliensis* *Actinomadura pelletieri* (1, 24, 26, 28, 48-49).

En México, los casos de micetoma se distribuyen principalmente en las áreas centro-occidental y centro-meridional del territorio nacional, predominando en el sur de Guanajuato, norte de Michoacán, parte de Jalisco y Querétaro, sur de Puebla, norte de Oaxaca y Guerrero (2,46). En un estudio para determinar la incidencia del micetoma en México, se obtuvo información de un total de 2015 casos de micetoma en un período de 30 años (1956-1985) con una incidencia promedio de 70 casos

anuales. 76.1% de los casos eran del sexo masculino y 23.9 del sexo femenino. El 58% de los micetomas se encontraron entre los 16 y 40 años y el 60.2% fueron agricultores. El 64.1% de los casos presentaron la enfermedad en extremidades inferiores, el 17.4% el tronco y un 13.6% en las extremidades superiores. En este estudio los estados con mayor incidencia fueron: Jalisco, Nuevo León, San Luis Potosí, Morelos y Guerrero (46). Del total de los casos, el 17.4% (350) fueron obtenidos del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José E. González”.

En la estadística realizada de enero de 1990 a diciembre de 2003 por el MCP Humberto Cantú en pacientes del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González (15). Se encontraron 101 casos de micetomas. En promedio se reportaron 8 pacientes anuales. 42% de los pacientes eran originarios de Nuevo León, observándose en Monterrey 19 casos; Montemorelos, Dr. Arroyo y Linares 5 casos en cada uno y en Galeana 3 casos. El 20% de los pacientes provenían de San Luis Potosí, 13% de Tamaulipas y el 25% restante de Zacatecas, Jalisco, Veracruz e Hidalgo (15).

PATOGENIA

El micetoma es el resultado de la implantación traumática de microorganismos que se encuentran en el medio ambiente a través de la piel del huésped. Incide más en individuos que trabajan sin calzado en el campo donde los agentes etiológicos abundan y la vegetación rastrera presenta espinas causando así las heridas (48). La infección afecta principalmente extremidades inferiores, tronco y extremidades superiores, aunque se han visto en otras localizaciones como cabeza (97) y región perianal (20).

Los actinomicetomas afectan la piel y se diseminan a través de la fascia y tejido celular subcutáneo hasta invadir y destruir tejido conectivo y hueso. Dependiendo de su localización pueden diseminarse a la cavidad torácica y abdominal o por otras regiones del cuerpo, pudiendo en ocasiones llegar a ser sistémica. Clínicamente las lesiones pueden causar deformaciones de las partes involucradas, y pérdida de su función. En casos aislados infecciones pueden llegar a ser fatales (70).

El cuadro clínico del micetoma es una tumoración en la región afectada, produciendo posteriormente deformación de la misma y la presencia de abscesos,

fístulas y secreción sero-purulenta con granos del cual se puede identificar y aislar el agente etológico (39, 92, 97).

Las lesiones se propagan a sitios adyacentes formando nuevas lesiones mientras que las antiguas se resuelven dejando cicatrices. En la mayoría de los casos el involucro a hueso aparece en las etapas tardías de la enfermedad en lesiones que han durado varios años, sin embargo en algunos casos puede aparecer en poco tiempo (28, 39, 97).

Algunos estudios reportan que la mayoría lesiones son indoloras o poco dolorosas y sólo el 20% de los casos refieren dolor debido a sobreinfección y/o al involucro óseo (28). Puede haber casos agresivos en las infecciones por actinomicetos, observándose en ellos un edema difuso y mal definido con mayor tendencia a invadir tejidos adyacentes, con una progresión más rápida de la enfermedad y con un compromiso óseo extenso y precoz (48). La afección ósea depende de la virulencia del organismo infectante y la respuesta inmune del hospedero(42).

Los microorganismos causales pueden estar presentes en los abscesos o la secreción de las fístulas (62). Histológicamente los abscesos están caracterizados por granulomas, que contienen numerosos polimorfonucleares, células gigantes, plasmáticas e histiocitos. Algunos de los organismos causales se pueden encontrar en forma de granos y pueden ser identificados por la presencia de hifas macro o microsifonadas y por su tamaño, color, consistencia y características tintoriales(2).

Los miembros del género *Nocardia* pertenecen a un grupo de microorganismos conocidos como actinomicetos aerobios que pertenecen al orden *Actinomycetales*. *Nocardia* contiene ácidos micólicos pero difieren de las micobacterias porque poseen cadenas más cortas de ácidos micólicos. Son bacilos Gram positivos ramificados cuyas hifas frecuentemente se fragmentan a formas cocobacilares. *Nocardia* se encuentra distribuida mundialmente y son saprofíticas, lo cual las hace un componente importante de la microflora normal del suelo y se asocia frecuentemente con agua (28, 63, 86, 88, 94, 97). Se puede asociar también al material de las plantas en descomposición, el polvo y el aire. *Nocardia brasiliensis* se asocia a ambientes tropicales y subtropicales y se encuentra generalmente entre las latitudes 15° al sur y 30° al norte, en México, a pesar de las diferencias ambientales, ocupa el primer lugar como agente causal de esta enfermedad (28, 63, 94, 97).

Con el fin de conocer más la fisiopatología y los procesos del actinomicetoma, se han estudiado los mecanismos de infección de los agentes causales y para ello se han empleado modelos animales principalmente ratones y ratas (8, 17, 37, 54, 91).

Los primeros en desarrollar micetoma experimental en ratones por *N. brasiliensis* fueron González-Ochoa y cols. (37). Ellos observaron la formación de gránulos al inocular la bacteria de manera intraperitoneal. En 1963 Macotella-Ruíz y Mariat trabajaron con hámsteres y cobayos, produciendo lesiones experimentales al

inocular *N. brasiliensis* o *N. asteroides* en cavidad peritoneal o tejido celular subcutáneo (47). En 1969, González-Ochoa produjo micetomas experimentales con éxito en el cojinete plantar de ratones, lo cual representa la vía de entrada de *Nocardia brasiliensis* al tejido humano (37).

Más adelante, Salinas y cols. desarrollaron micetoma experimental en ratones BALB/c. Para ello emplearon *N. brasiliensis* cultivado en agar cerebro-corazón una suspensión unicelular conteniendo 10^7 UFC por ml. Se inyectaron alícuotas de la suspensión en solución salina en cojinete plantar de los ratones (65, 91).

Vera-Cabrera y cols. desarrollaron micetomas experimentales por *N. brasiliensis* en ratas, las cuales en un inicio desarrollaron lesiones, pero 20 días después de la infección desarrollaron una curación espontánea, a diferencia de los ratones, en los cuales se puede desarrollar una infección crónica. Con los datos anteriores se concluyó que el sistema inmune de las ratas es más eficiente para resolver esta infección (91).

TRATAMIENTO

El tratamiento del micetoma depende de su etología, en el caso de los eumicetomas se indican antimicóticos además de debridación y/o escisión quirúrgica. En los actinomicetomas se utilizaron en su inicio diversos agentes antimicrobianos entre ellos sulfonamidas (DDS, sulfametoxipiridazina y sulfadoxina), isoniacida, minociclina, estreptomina, rifampicina y tetraciclinas. Posteriormente se han reportado casos tratados con combinaciones tales como amoxicilina/ácido clavulánico, trimetoprim/sulfametoxazol + amikacina e imipenem + amikacina con buenos resultados (11, 26, 28, 33-34, 42, 70, 92, 94-97) .

El tratamiento de elección para los actinomicetomas son las sulfonamidas en especial el sulfametoxazol combinado con trimetoprim (SXT), pero una de sus desventajas es que este esquema terapéutico tiene que ser empleado por varios meses incluso años y sólo se obtiene un 70% de curación (86-88, 94-97). Existen diversas combinaciones reportadas en la literatura en donde se ha observado un incremento en la respuesta terapéutica como al combinar SXT con diaminodifenilsulfona (1.5mg/kg/día) vía oral en dosis única o estreptomina (15mg/kg/día) IM durante 1 mes (96). En los casos que no responden a SXT se puede emplear amoxicilina-ácido clavulánico 1.5 gr/día durante 6 meses (97).

Se han reportado terapias con amikacina en combinación con SXT en casos resistentes a tratamientos previos o que son extensos, aquéllos que afecten el hueso o tengan tendencia a diseminarse a órganos vecinos, o bien, que considerados difíciles de tratar. Con esta combinación se ha obtenido una mejor tasa de curación en un periodo más corto (67, 86-88, 97).

El tratamiento combinado se administra en ciclos, denominando un ciclo como el periodo de la administración simultánea de amikacina (15 mg/kg/día) dividida en 2 dosis diarias por 3 semanas y SXT (7-35 mg/kg/día) por 5 semanas (97). Las tasas de curación obtenidas con el uso de esta combinación es del 95%.

Debido a los efectos secundarios al tratamiento de amikacina + SXT y los otros antimicrobianos previamente empleados, se han evaluado otros agentes para tener alternativas terapéuticas, tales como oxazolidinonas, tetraciclinas, aminoglicósidos, beta-lactámicos, quinolonas, sulfonamidas, amoxicilina-acido clavulánico, imipenem, entre otros con menores respuestas (11-12, 36, 86-89, 98).

Previamente se han realizado estudios en la evaluación de nuevas terapias antimicrobianas sobre *Nocardia brasiliensis* como en la que se trabajó con 44 antimicrobianos de diferentes grupos químicos incluyendo aminoglicósidos, cefalosporinas, penicilinas, quinolonas, macrólidos y a una oxazolidinona, linezolid (87-88). En ese trabajo se determinó la actividad *in vitro* y *en vivo* de dichos antimicrobianos en ratones BALB/c. Se observó que la mayoría de los aminoglicósidos tenían actividad contra el 100% de las cepas utilizadas. En los

ensayos los beta-lactámicos no mostraron buena actividad excepto al combinarse con inhibidores beta-lactámicos, como amoxicilina y ácido clavulánico. SXT fue activo sobre la mayoría de las cepas. Los antimicrobianos pertenecientes al grupo de las cefalosporinas, macrólidos, carbapenems y quinolonas no tuvieron actividad sobre las cepas de *N. brasiliensis* utilizadas. Se observó que linezolid es altamente activo sobre *N. brasiliensis* y que todas las cepas utilizadas fueron sensibles a este compuesto. Además los resultados de linezolid fueron mucho mejor a los obtenidos con la combinación de amoxicilina y ácido clavulánico que se ha demostrado que es activa en infecciones en humanos por *Nocardia brasiliensis* (36, 87).

En estudios previos se ha comprobado la susceptibilidad de *Nocardia brasiliensis* en un 100% a las oxazolidinonas (linezolid) (14, 36, 87).

Debido a la resistencia observada con el tratamiento habitual empleado se ha visto la necesidad de implementar nuevos esquemas terapéuticos, como en este caso las oxazolidinonas, por lo que en este trabajo se pretendió evaluar y demostrar su eficacia en la terapéutica del micetoma experimental.

Las oxazolidinonas constituyen una clase de antimicrobianos de reciente descubrimiento, con un mecanismo de acción distinto que se introdujo para atacar el problema de las bacterias Gram positivas multi-resistentes a los antimicrobianos ya conocidos. Estos compuestos son bacteriostáticos, aunque se comportan como bactericidas frente algunas bacterias. Rara vez se han reportado el desarrollo de resistencia a estos compuestos (13, 45).

El mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis proteica en un sitio distinto a los otros antimicrobianos, fijándose a la subunidad 50S en un lugar distinto al del cloranfenicol y lincosaminas, inhibiendo la formación del complejo de iniciación 70S (14, 25, 29, 36, 52, 58-59, 73, 100, 102). Inhibe la formación del complejo N-formil-metionina-ARN-t, el cual es un requisito para el inicio del proceso de traducción. No inhibe la elongación ni la terminación de la síntesis proteica.

El desarrollo de estos medicamentos surgió por Du Pont Pharmaceuticals® en los 80's pero sus primeros análogos (DuP 105 y DuP 721) no pudieron ser sintetizadas como fármacos. Uphohn reinició en 1987 la investigación, siendo hasta 1990 cuando se sintetizó linezolid, y eperezolid, aunque hasta hace algunos años (2000) se empezó a comercializar linezolid (75).

Este último posee una estructura tricíclica, anillos fluorados y grupos piperizínicos que potencian su actividad y un grupo morfolino que aumenta su solubilidad y perfil farmacocinético (25, 29,-32, 52, 58, 64, 73).

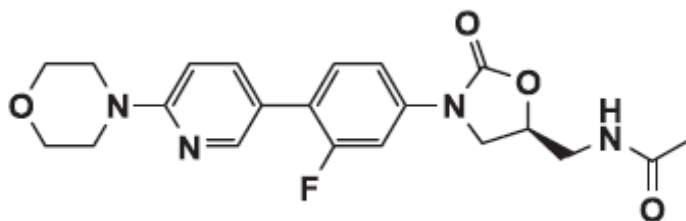


Fig. 1 Estructura química de Linezolid

De las oxazolidinonas, el primer y único compuesto aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) es linezolid (5), el cual ha mostrado actividad inhibitoria *in vitro* contra bacterias gram positivas, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, incluyendo cepas multi-resistentes, con CMI₅₀ ente 0.5 y 4 µg/mL (35, 102). Además, presenta actividad inhibitoria contra varias actinobacterias gram positivas, incluyendo *Nocardia*, *Actinomadura* y *M. tuberculosis* (14,18, 83, 87-88). Se considera el primer antimicrobiano con actividad ante todas las especies de *Nocardia* (14).

Linezolid es eficaz al ser administrado tanto por vía intravenosa como por vía oral; técnicamente se clasifica como bacteriostático contra una gran cantidad de patógenos *in vitro*, pero *in vivo* se comporta como un antimicrobiano bactericida (101).

Gómez-Flores y cols. reportaron la actividad *in vitro* de linezolid, la cual fue comparada con otros antimicrobianos: amikacina, SXT y amoxicilina-ácido clavulánico en su efecto contra 25 cepas de *Nocardia brasiliensis* aisladas de pacientes con micetoma (86). Los resultados obtenidos mostraron que todas las

cepas probadas fueron sensibles a linezolid (CMI₉₀ 2µg/ml y CMI₅₀ 1µg/ml), comparadas con amikacina (CMI₉₀ 4µg/ml y CMI₅₀ µg/ml), amoxicilina/ácido clavulánico (CMI₉₀ 4µg/ml y CMI₅₀ 2µg/ml) y SXT (CMI₉₀ 9.5/0.5 µg/ml CMI₅₀ 9.5/0.5 µg/ml) (86).

En un estudio posterior, se probó la actividad de linezolid, amoxicilina-ácido clavulánico y amikacina en un modelo experimental de micetoma en ratones BALB/c, observándose la actividad más alta con linezolid, seguida por amoxicilina-ácido clavulánico y amikacina (36).

En cuanto a la experiencia clínica, linezolid ha sido empleado con éxito en el manejo de abscesos cerebrales por *N. farcinica* en pacientes pediátricos de trasplante renal (89) e inclusive fue utilizado exitosamente en un paciente de nuestro servicio de Dermatología con nocardiosis subcutánea por *Nocardia transvaliensis* con linfopenia CD4+ idiopática, resistente a sulfas, aminoglicósidos y quinolonas, el cual presentaba abscesos metastáticos. Se le administró linezolid VO, 600mg/día por 3 meses, obteniendo curación total (96-97).

Se han reportado efectos adversos asociados al uso prolongado de linezolid, como mielosupresión y neuropatía periférica (56). Por tal motivo se han desarrollado nuevas oxazolidinonas más potentes y con una menor toxicidad.

DA-7157 ((R)-3-(4-(2-(2-metiltetrazol-5-il)-piridin-5-il)-3-fluorofenil)-5-hidroximetiloxazolidin-2-ona) es una nueva oxazolidinona que se ha probado *in*

in vitro en aislados clínicos de bacterias aerobias y anaerobias (43). Su presentación es en polvo, no es flamable y se almacena a temperatura ambiente (20°C) en recipientes oscuros. Es insoluble en agua y se solubiliza con dimetilformamida, teniendo una estabilidad en suspensión o solución hasta por 14 días a 20°C.

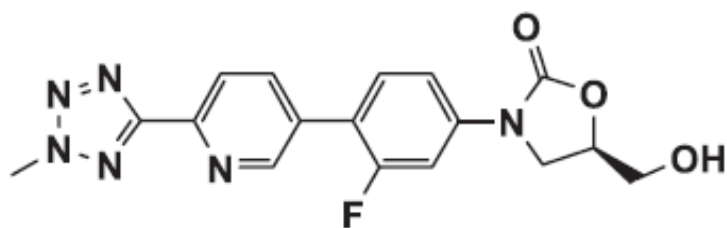


Fig. 2 Estructura Química de DA-7157

Un estudio realizado con DA-7157, se llevó a cabo con cepas aisladas de especímenes clínicos de pacientes en un Hospital Universitario en Corea del Sur durante 2002-2004. Se determinaron las CMI para varios microorganismos incluyendo patógenos resistentes a antibióticos (23). Entre los resultados obtenidos, se encontró que todos los aislados Gram positivos fueron inhibidos y demostró una excelente actividad en aislados Gram positivos anaerobios, comprobándose que DA-7157 es un potente agente nuevo con alta actividad *in vitro* sobre los patógenos gram-positivos comunes aerobios y anaerobios, incluyendo las cepas multi-drogo resistentes con mayor actividad que linezolid.

DA-7157 tiene una pro-droga, DA-7218, lo cual implica que este es un derivado farmacológicamente inactivo de la droga activa. Las pro-drogas están diseñadas para maximizar la cantidad de sustancia activa que alcanza el sitio de

acción, a través de la manipulación de propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas o farmacocinéticas de la sustancia. Éstas, se convierten en sustancia activa dentro del cuerpo a través de reacciones enzimáticas o no enzimáticas. El objetivo de las pro-drogas es sobrepasar las barreras como la baja absorción oral, falta de especificidad en el sitio de acción, inestabilidad química o toxicidad.

DA-7218 ((R)-3-(4-(2-(2-metiltetrazol-5-il)-piridin-5-il)-3-fluorofenil)-2-oxo-5-oxazolidinil) metildifosfato de sodio) es la pro-droga de DA-7157, la cual a diferencia de su droga, cuenta con una porción hidrosoluble, lo cual facilita su empleo. Se ha demostrado que es hidrolizado por la vía de la fosfatasa a su metabolito activo, DA-7157, y por lo tanto es éste quien llega a su blanco (21).

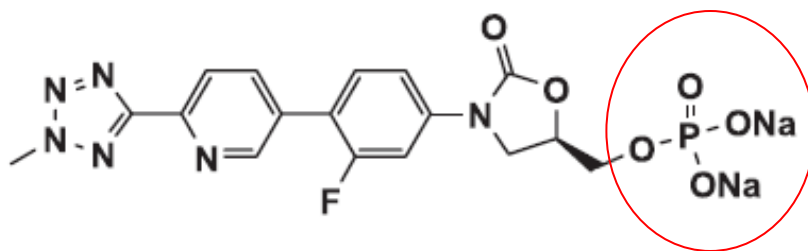


Fig. 3 Estructura Química de DA-7218. En el círculo se muestra el grupo fosfato de sodio, el cual lo diferencia de DA-7157.

Previamente se realizó un estudio en el que se probó su eficacia en un modelo murino sub-agudo de neumonía inducido por *S. pneumoniae* susceptible a penicilina (PSSP) y se comparó con linezolid mostrando una mayor eficacia en

neumonía pneumocócica (21, 23). DA-7218 mejoró la supervivencia de los ratones infectados con PSSP mostrando menor infiltración neutrofílica y una reducción en el recuento bacteriano en los tejidos pulmonares en comparación con los ratones tratados con linezolid. Además se ha demostrado su actividad contra *Staphylococcus* y *Enterococcus* (22).

Debido a las necesidades actuales y para entender mejor la respuesta a estos nuevos medicamentos se han empleado diferentes modelos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* con el fin de reproducir la infección observada en humanos, semejando la respuesta *in vivo* y entender así el comportamiento de los microorganismos en un ambiente real. En los primeros ensayos utilizaron modelos con macrófagos de diversos orígenes, principalmente murinos (alveolares, peritoneales, esplénicos) (3, 38). Sin embargo con el tiempo se desarrollaron ensayos empleando modelos de monocitos humanos (THP-1) los cuales tienen la capacidad de transformarse en macrófagos al añadirle ésteres de forbol (81).

Con el fin de evaluar el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* y determinar si se correlaciona con la virulencia previamente estudiada en modelos animales, se emplearon ensayos con macrófagos THP-1. En este tipo de modelos, se han comparado la actividad de diversas cepas en cuanto a virulencia, rapidez de crecimiento y su susceptibilidad a antimicrobianos (61, 78-79). También se han realizado diversos estudios con *M. tuberculosis* y complejo *M. avium* en los cuales se emplearon diversos antimicrobianos entre los cuales se encuentran, quinolonas, macrólidos, sulfonamidas y oxazolidinonas (50-51, 57, 76, 82, 99).

En el caso particular de este estudio, debido a que *N. brasiliensis* es una bacteria intracelular facultativa, se utilizó el modelo de macrófagos THP-1, para evaluar la actividad intracelular de DA-7157.

En el presente trabajo se evaluó la sensibilidad *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, de *Nocardia brasiliensis* a DA-7157, una nueva oxazolidinona, y su pro-droga DA-7218.

IMPORTANCIA

La relevancia de realizar este trabajo consiste en aportar información y nuevas herramientas terapéuticas para el abordaje del actinomicetoma, ya que el tratamiento actual, si bien aún es efectivo, es cada vez más frecuente encontrar casos de resistencia.

ORIGINALIDAD

DA-7157 es una oxazolidinona de reciente desarrollo de la cual no se conocen su actividad y eficacia sobre *Nocardia brasiliensis* *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*, en monocapas de macrófagos THP-1. Con este estudio se pretende aumentar las herramientas para el tratamiento de micetoma por *N. brasiliensis*.

JUSTIFICACIÓN

El actinomicetoma es una enfermedad en la que algunos casos se desarrolla resistencia bacteriana al tratamiento y/o toxicidad, por lo cual es importante evaluar la efectividad de nuevos antimicrobianos que puedan funcionar como alternativas terapéuticas con mejor eficacia y menores efectos secundarios..

El empleo de nuevos modelos de infección nos permitiría entender las respuestas de *N. brasiliensis* tanto *in vivo* como en monocapa de macrófagos THP-1 y en su comportamiento intracelular frente a los antimicrobianos.

HIPÓTESIS

Nocardia brasiliensis es sensible *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* a DA-7157, una nueva oxazolidinona.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la actividad y eficacia del DA-7157 sobre *Nocardia brasiliensis* tanto *in vitro* como *in vivo* en un modelo experimental murino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la sensibilidad *in vitro* de aislamientos clínicos de *Nocardia brasiliensis* a DA-7157 y DA-7218.
2. Establecer un modelo de infección de *Nocardia brasiliensis* en monocapas de macrófagos THP-1.
3. Determinar el efecto de la droga y su pro-droga en la monocapa de macrófagos THP-1 infectados con *Nocardia brasiliensis*.
4. Determinar los niveles en plasma de la pro-droga y la droga en ratones BALB/c.
5. Realizar ensayos *in vivo* en ratones previamente infectados con *Nocardia brasiliensis* utilizando la pro-droga.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trata de un estudio experimental *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* de tipo longitudinal, comparativo, prospectivo, abierto y controlado con placebo.

Recursos biológicos:

1. Grupos de ratones BALB/c hembras de entre 8-12 semanas de edad.
2. Línea celular de monocitos humanos THP-1: Es una línea celular de monocitos humanos originada de un paciente con leucemia monocítica aguda (ATCC TIB-202). Esta línea celular crece en suspensión y al añadirse ésteres de formol se diferencian en células con características de macrófagos y con una respuesta similar a la producida por los macrófagos de origen natural cuando son infectados.
3. Cepas de *Nocardia brasiliensis* aisladas de pacientes, pertenecientes a la colección del Laboratorio Interdisciplinario de Dermatología.

Recursos materiales:

Se utilizaron las instalaciones del Laboratorio Interdisciplinario de Dermatología; el Bioterio y el laboratorio de la División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS.

Medicamentos:

- DA-7157 ((R)-3-(4-(2-(2-metiltetrazol-5-il)-piridin-5-il)-3-fluorofenil)-5-hidroximetiloxazolidin-2-ona) fue proporcionado por Dong-A Pharm (Corea del Sur)
- DA-7218 ((R)-3-(4-(2-(2-metiltetrazol-5-il)-piridin-5-il)-3-fluorofenil)-2-oxo-5-oxazolidinil)metildifosfato de sodio) fue proporcionado por Dong-A Pharm (Corea del Sur)
- Linezolid (Zyvox, Pfizer, Bolsa con solución para infusión con 2 mg/ml con 300 ml)
- Trimetoprim/Sulfametoxazol (Sigma Chemical Products)

1. Determinación de la sensibilidad *in vitro* de aislamientos clínicos de *Nocardia brasiliensis* a DA-7157 y DA-7218 (Concentración mínima inhibitoria).

Se evaluó la Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los medicamentos antes mencionados. Para cada medicamento se realizaron placas de microtitulación con las siguientes diluciones seriadas de 32 µg/ml a 0.0625 µg/ml, un control positivo de infección y uno negativo sin presencia de inóculo de *Nocardia*. Para la realización de este procedimiento se baso en el método M24-A del CLSI (antes llamado NCCLS) (53). Se tomó una colonia de *Nocardia brasiliensis* y se maceró, ajustando a McFarland 1. Se tomó 0.1 ml y se colocó en cada pozo de la microplaca. Se incubó a 37°C y se tomó una lectura provisional a las 24 hrs, obteniendo la lectura definitiva a las 48 hrs. Se empleó esta técnica con diversas cepas de *Nocardia brasiliensis* seleccionadas.

Preparación de los antimicrobianos para ser utilizadas en ensayos animales

- DA-7218: Fue diluida en solución salina libre de pirógenos y administrada a una dosis de 5mg, 12.5mg y 25mg/kg.
- Linezolid: En ensayos animales, se tomó de la presentación comercial y fue diluida en solución salina a una concentración de 25 mg/kg.
- Trimetoprim/Sulfametoxazol: Se utilizó la presentación comercial y fue diluida en solución salina (50 mg/kg).

Preparación de los antimicrobianos para ser utilizadas en ensayos con macrófagos

- DA-7157: Se diluyó la sustancia pura en 1 ml de dimetilsulfóxido (Productos Químicos Monterrey) + 4 ml de solución salina libre de pirógenos
- DA-7218: Fue diluida en solución salina libre de pirógenos
- Linezolid: Se pesó la sustancia pura y fue diluida en solución salina a la concentración de 25 mg/kg.

2. Estandarización de Modelo de infección de *Nocardia brasiliensis* en monocapas de macrófagos THP-1

Se utilizaron macrófagos de la línea celular THP-1 las cuales se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Sigma Chemical Products) y se sembraron en microplacas de titulación de 24 pozos a una densidad de 4×10^5 por pozo en presencia de 10 μm de 12-miristato-13-acetato de Forbol (PMA). Se descongeló la suspensión de *Nocardia brasiliensis* previamente preparada y se diluyó hasta llegar a una concentración de 0.4×10^6 UFC/ ml. Se agregó la suspensión de *Nocardia brasiliensis* a una relación bacteria: macrófago 1:1 y 3:1 para después completarla con medio RPMI 1640. Se infectaron 20 pozos para posteriormente colocarlos a 37 C° en la incubadora de CO₂ al 5% por espacio de una hora. Se retiró el sobrenadante de los primeros 3 pozos (Tiempo 0, T0) y se realizaron cuentas por el método de dilución seriada en agar BHI en base 10. Posteriormente se agregó agua destilada a 4 grados C° a los primeros 3 pozos (T0) dejándola actuar por 15 minutos para posteriormente retirarla y realizar diluciones seriadas y sembrarse por triplicado. Se retiró el sobrenadante del resto de los pozos y se realizó lavado con PBS a 37 C°. Enseguida se agregó RPMI 1640 para re-incubarse por 1 hora más. A la hora se agregó agua destilada a los siguientes 3 pozos y se retiró el contenido y se sembró por triplicado. Lo anteriormente descrito se repitió a las 3, 6, 24 y 48 horas. Luego de obtener las muestras a los tiempos mencionados, las muestras se sembraron en agar y se incubaron a 37°C para determinar las unidades formadoras de colonias a las 120 hr.

3. Observación con Microscopía Óptica

Para facilitar su observación al microscopio se utilizaron cámaras de cultivo Lab-Tek® II de 2 y 4 cámaras, a las cuales se les colocó el triple de lo contenido en las microplacas de titulación (2 cámaras) y la misma cantidad (4 cámaras), de acuerdo a la capacidad de las cámaras (2ml con 2.4×10^6 y 1ml con 1.2×10^6 respectivamente). Se realizaron los pasos previamente descritos en el modelo de infección de macrófagos THP-1. Para tener un control negativo se dejaron cámaras sin infectar, las cuales fueron fijadas con formol y teñidas con Ziehl-Nielsen. El resto de las cámaras se fijaron con formol para posteriormente teñirse con Kinjoun, Ziehl-Nielsen o Azul de metileno. Se observaron con microscopia óptica a 10X, 40X y 100X (inmersión). Se observaron las laminillas al microscopio para determinar el comportamiento de *Nocardia brasiliensis* sobre la monocapa de macrófagos y compararlo con las cuentas realizadas en las placas con medio BHI, a las horas determinadas. Con esta observación se determinó el tiempo adecuado y la concentración a emplear en el ensayo terapéutico.

4. Determinación del efecto de DA-7157 y DA-7218 sobre macrófagos infectados con *Nocardia brasiliensis*.

Se preparó una microplaca de cultivo de 24 pozos (BD Falcon Primaria Tissue Culture Multiwell Plates, 24 pozos, Becton Dickinson, San José California, EUA) con monocapas de macrófagos THP-1, conteniendo aproximadamente 0.4×10^6 macrófagos por pozo. Se descongeló una suspensión previamente preparada de *Nocardia brasiliensis* (conociendo previamente la cantidad de UFC/ml). Se diluyó esta suspensión dejando la suspensión final con una relación 3:1 *Nocardia brasiliensis*: Macrófagos por mililitro. Se completó con medio RPMI 1640 a 1ml. Se colocó 1ml de la nueva suspensión ajustada en cada pozo y posteriormente se colocó la microplaca en la incubadora de CO₂ por espacio de una hora. Se retiró de la incubadora, se extrajo el sobrenadante, se separó y se realizaron cuentas por triplicado. Se colocó 1ml de medio RPMI diluido con el medicamento a evaluar en cada uno de los pozos. Se utilizaron las siguientes diluciones: 0.25, 1, 4 y 16 veces la CMI previamente obtenida, para las drogas a emplear: DA-7218 y DA-7157. Se utilizó como control positivo linezolid, a la misma dilución. Se recolocó la microplaca en la incubadora de CO₂ por espacio de 6 hrs. Al transcurrir el tiempo establecido, se retiraron las placas de la incubadora y se extrajo el contenido de cada uno de los pozos y se sembró por triplicado en placas de

Petri. Con lo anterior se realizó el conteo por medio de UFC y así se evaluó el efecto del medicamento sobre los macrófagos previamente infectados.

Debido a que la cuantificación de *Nocardia brasiliensis* por el método de dilución en agar no correspondía a lo observado en las preparaciones especiales a la microscopía óptica, fue necesario establecer un método cualitativo y cuantitativo más apegado a lo observado. Debido a lo anterior se decidió emplear el método de Azul Alamar, el cual mide la fluorescencia proporcionalmente al número de células vivas y corresponde a la actividad metabólica celular (producción de $\text{NADH} + \text{H}^+$). Las células no viables o dañadas tienen una actividad metabólica menor y por lo tanto generan una señal proporcionalmente menor al de las células sanas. Este método es empleado en otros casos como en ensayos con *M. tuberculosis*, modificándolo y adaptándolo a las características propias de *N. brasiliensis* y se decidió medir por fluorescencia.

El objetivo de usar Azul Alamar fue para realizar una medición de la proliferación celular y citotoxicidad. Este método es un indicador de oxidación y reducción (REDOX) que fluoresce en respuesta a la reducción del metabolismo celular, midiendo NADPH.

Para poder emplear este método como parte fundamental del trabajo, se estableció una curva de referencia. En la curva se utilizó *N. brasiliensis* previamente cuantificado con el método tradicional y se realizaron diluciones

seriadas de tal manera que se trabajó con 0.6 a 2×10^6 UFC de HUJEG-1(ATCC 700358).

Se colocaron las diluciones previamente mencionadas en tubos eppendorf de 1.5ml y se centrifugaron a 10,000 RPM por 10min, Se decantó el sobrenadante para quedarnos solamente con el botón de *N. brasiliensis* y se agregó 0.5 ml de Azul Alamar, preparado con medio LB (Luria Broth, Miller's modification, Sigma, EUA) 9:1 Alamar azul (AlamarBlue, Biosource Europe, Nivelles Belgium). Después de agregar 0.5ml de Azul alamar a cada uno de los tubos Eppendorf se cerraron a presión y se colocaron sobre bases ajustadas en rotación continua a 37°C por 24 hrs en horno de micro-hibridación (Autoblot microhybridization Oven, OMRON ESCS, BellCo Glass Inc. Vineyard ,NJ, EUA). Posterior a las 24 hrs de incubación, se tomaron 100 µl de cada uno de los tubos y se colocó en microplacas de titulación de 96 pozos (Microtest primaria Flat bottom, Tissue Culture plate, 96 well flat bottom with low evaporation lid, Becton Dickinson Labware, Falcon, San José, California), para ser leído en BioTek Synergy 2 Multi-Detection Microplate Reader, en modo de Fluorescencia, utilizando el programa GEN5 para su interpretación y análisis

5. Determinación de las concentraciones plasmáticas de DA-7218 y DA-7157 en ratones BALB/c

Se determinaron las concentraciones plasmáticas de los antimicrobianos previamente mencionados en ratones BALB/c para observar los picos plasmáticos y determinar la posología que se utilizó en el modelo experimental terapéutico. Se utilizaron 3 dosis de DA-7218. Las dosis empleadas fueron 5mg/kg, 12.5mg/kg y 25mg/kg. Se preparó la dilución del antimicrobiano según la dosis y se trabajó una dosis por día. Para cada dosis estipulada, se inyectó en el lomo de 3 ratones vía subcutánea, excepto en los ratones del tiempo 0. Se tomaron muestras de sangre (500 µl) del seno infraorbitario de cada ratón a diferentes tiempos: 0 min, 20 min, 40 min, 60 min, 120 min, 240 min, 360 min, 420 min, 540 min, y 600 min. Se utilizaron un total de 30 ratones para cada dosis, total de 90 ratones, los que se sacrificaron posteriormente con éter. La sangre obtenida se centrifugó en micro-centrífuga a 10,000 RPM por 5 minutos y se separó del plasma y éste se congeló a -70°C. Posteriormente se determinaron las concentraciones plasmáticas por medio de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC). Al obtener los resultados de las concentraciones plasmáticas de DA-7812, se evaluaron los mismos pasos para obtener la concentración plasmática de DA-7157, empleando la dosis de DA-7218 que mejor concentración obtuvo.

6. Cuantificación de las concentraciones plasmáticas por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)(1)

La proteína sérica se precipitó combinando 50 μL de muestra con 150 μL de acetonitrilo. La mezcla fue agitada por medio de un vortex por 10 segundos y centrifugada por 5 minutos a 5304xg, y el sobrenadante fue filtrado por filtros de nylon de 0.45 μL (Waters). Los filtrados se vertieron en contenedores de 150 μL y se inyectaron para su análisis cromatográfico. La separación cromatográfica de los antimicrobianos se obtuvo utilizando un cromatógrafo líquido Waters 2690 Alliance con detector de arreglo de diodos 996 (DAD) y detector de fluorescencia 474. Se utilizó una columna Atlantis dC18 de 150 mm x 4.6 mm I.D., con una partícula de 5 μm (Waters). La temperatura de la columna se mantuvo a 30°C. Las muestras fueron eluidas con una fase móvil, la cual consiste de ácido tricloroacético al 0.1% (solvente A) y acetonitrilo (solvente B); se utilizó un programa de gradiente para la elución.

7. Ensayos *in vivo* en ratones BALB/c

- Desarrollo de micetoma en ratones:

Para la producción experimental del micetoma en los ratones BALB/c se siguió el método desarrollado por González-Ochoa y cols. (37) modificado por Gómez-Flores y cols.(36).

- Preparación del inóculo:

Se preparó el inóculo de *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1(ATCC 700358), la cual fue cultivada en caldo BHI (Brain-Heart-Infusion, BD, Bioxon) a una temperatura de 37°C en agitación continua a 110 RPM por 72 horas. Se separó la masa bacteriana por centrifugación, y se lavó 4 veces con solución salina. Posteriormente se maceró en un tubo de Potter-Evelham, se dejó sedimentar la suspensión y la masa bacteriana se lava una vez más con solución salina y se ajustó el inóculo a un peso neto de 20 mg de *N. brasiliensis* por 50 µL de solución salina.

- Infección experimental:

Se realizó el modelo experimental inoculando a los ratones BALB/c para el desarrollo de micetoma. Se preparó el inóculo, se inoculó 20 mg de peso húmedo de *Nocardia brasiliensis*, por vía subcutánea en el cojinete plantar de los ratones y se esperó el tiempo necesario para que se desarrollara el micetoma (1 semana). Se utilizó el método basado en el descrito por González- Ochoa y colaboradores (37).

- Ensayos terapéuticos

Se realizaron ensayos terapéuticos empleando la pro-droga ya que debido a su fórmula química al contar con una fracción hidrosoluble se facilita su empleo y al metabolizarse la pro-droga en el cuerpo se pierde esa fracción quedando la droga en sangre, alcanzando finalmente el objetivo.

Basados en los resultados de las concentraciones plasmáticas obtenidas por la HPLC, se seleccionaron las dosis de los antimicrobianos que se mantuvieron por encima del CMI para *Nocardia brasiliensis* por un período de tiempo mayor. Debido a que la terapia combinada es más efectiva para el actinomicetoma, se decidió realizar combinaciones de los antimicrobianos con SXT, tratamiento de elección en actinomicetoma, para estudiar posibles efectos sinérgicos sobre *N. brasiliensis*.

Siete días después de la inoculación de *N. brasiliensis*, se seleccionó un grupo de 15 ratones para cada dosis seleccionada y un grupo control a base de solución salina libre de pirógenos. Se aplicaron las drogas vía subcutánea en el dorso del ratón cada 12 hrs, a completar 2 ciclos de 3 semanas con descanso de una entre cada ciclo. Se evaluaron los grupos al finalizar cada ciclo.

En el primer ensayo terapéutico, utilizamos 3 concentraciones de la prodroga, además de un grupo control, inoculados con *N. brasiliensis* HUJEG-1(ATCC 700358). Dividimos a los ratones hembra BALB/c en 4 grupos, de 15 ratones cada uno:

Grupo 1: Se administró DA-7218 a una dosis de 5 mg/kg administrados cada 12 horas vía subcutánea.

Grupo 2: Se administró DA-7218 a una dosis de 12.5 mg/kg administrados cada 12 horas vía subcutánea.

Grupo 3: Se administró DA-7218 a una dosis de 25mg/kg administrados cada 12 horas vía subcutánea.

Grupo 4: Control: se administraron 100 µL de solución salina cada 8 horas vía subcutánea a nivel del lomo.

Tras cada ciclo de tratamiento, se procedió a medir el diámetro antero-posterior de la lesión podal en el cojinete plantar. Se evaluaron las lesiones de acuerdo a la extensión de las lesiones, desde la ausencia de cambios inflamatorios en el cojinete plantar (neg ó 0) a una producción

excesiva de abscesos e inflamación sobrepasando los huesos del metatarso (4+), de acuerdo a una publicación previa (86).

Debido a la facilidad de las bacterias de desarrollar resistencia a monoterapias se realizó un segundo ensayo terapéutico utilizando la combinación de DA-7218 y SXT. Se utilizó SXT en preparaciones orales y DA-7218 vía S.C. además de linezolid y un grupo control con solución salina. En este ensayo terapéutico, utilizamos DA-7218 subcutáneo a 5 y 25 mg/kg comparado con la combinación DA-7218 a las dosis antes mencionadas y SXT vía oral 50 mg/kg comparados con un grupo control, tratados con solución salina. Dividimos a los ratones hembra BALB/c en 4 grupos, de 15 ratones cada uno:

Grupo 1: Se administró DA-7218 a una dosis de 25 mg/kg vía subcutánea cada 12 horas.

Grupo 2: Se administró DA-7218 a una dosis de 25 mg/kg vía subcutánea + SXT (50mg/kg) cada 12 horas.

Grupo 3: Se administró DA-7218 a una dosis de 5 mg/kg vía subcutánea cada 12 horas.

Grupo 4: Se administró DA-7218 a una dosis de 5 mg/kg vía subcutánea + SXT (50mg/kg) Via Oral cada 12 horas.

Grupo 5: Se administró linezolid a una dosis de 25 mg/kg vía subcutánea cada 12 horas.

Grupo 6: Control, Se administró 100 µL de solución salina inyectado vía subcutánea cada 12 horas.

Se analizaron los resultados obtenidos con las pruebas estadísticas para muestras no paramétricas Medianas de Mood, Dunnet y la prueba de Wilkinson.

RESULTADOS

1. **Determinación de la sensibilidad in vitro de aislamientos clínicos de *Nocardia brasiliensis* a DA-7157 y DA-7218 (Concentración mínima inhibitoria).**

Antimicrobiano	Rango (µg/ml)	CMI₅₀	CMI₉₀
Linezolid	0.12–2	0.5	1
DA-7157	0.5–2	1	1
DA-7218	8–>32	16	32

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria de linezolid, DA-7157 y DA-7218. Aquí se puede observar como la pro-droga, DA-7218 tiene una CMI mucho más elevada que linezolid y DA-7157.

2. Modelo de infección de *Nocardia brasiliensis* en monocapas de macrófagos

THP-1

Entre los resultados encontrados, se observó mejor respuesta en el modelo establecido en relación 3:1, por lo cual se empleo tal modelo para el siguiente experimento.

Horas	Sobrenadante	Fondo
1	1000	4800
3	1200	6900
6	600	7000
24	0	6000

Tabla 2. Relación de la cuenta en UFC de sobrenadante y fondo, en ensayo de infección de monocapa de macrófagos con *N. brasiliensis*, relación 1:1

A las 48 hrs no se observó crecimiento.

Horas	Sobrenadante	Fondo
1	260500	84000
6	4335	28617
24	4459	8150
48	29467	20984

Tabla 3. Relación de la cuenta de UFC del sobrenadante y fondo en ensayo de infección de monocapa de macrófagos con *N. brasiliensis*, relación 3:1. Los resultados muestran discrepancia entre lo observado al microscopio y las cuentas con UFC.

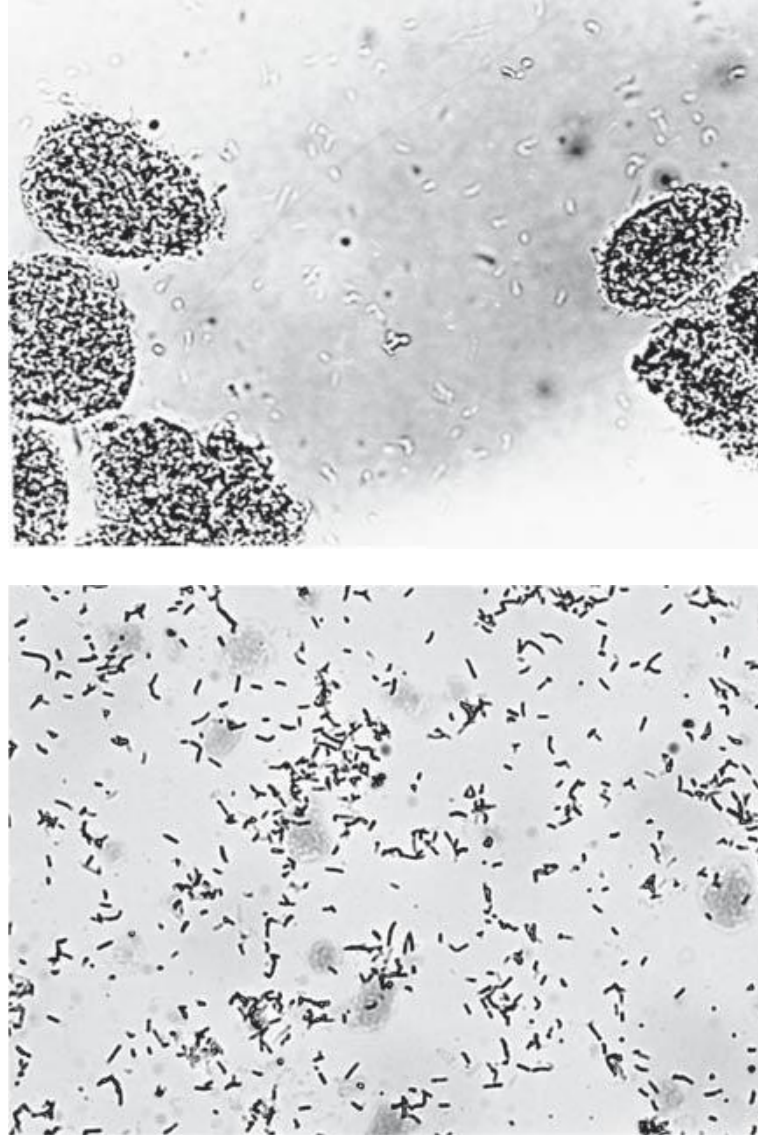


Fig. 4. Suspensión bacteriana de *N. brasiliensis* HUJEG-1(ATCC 700358) empleada para infectar la monocapa de macrófagos. Los acúmulos de bacteria (arriba) crecieron en medio BHI fueron mecánicamente disgregados con un potter (Evelham-Potter) para obtener una suspensión compuesta de pequeños filamentos individuales de *Nocardia* (abajo).

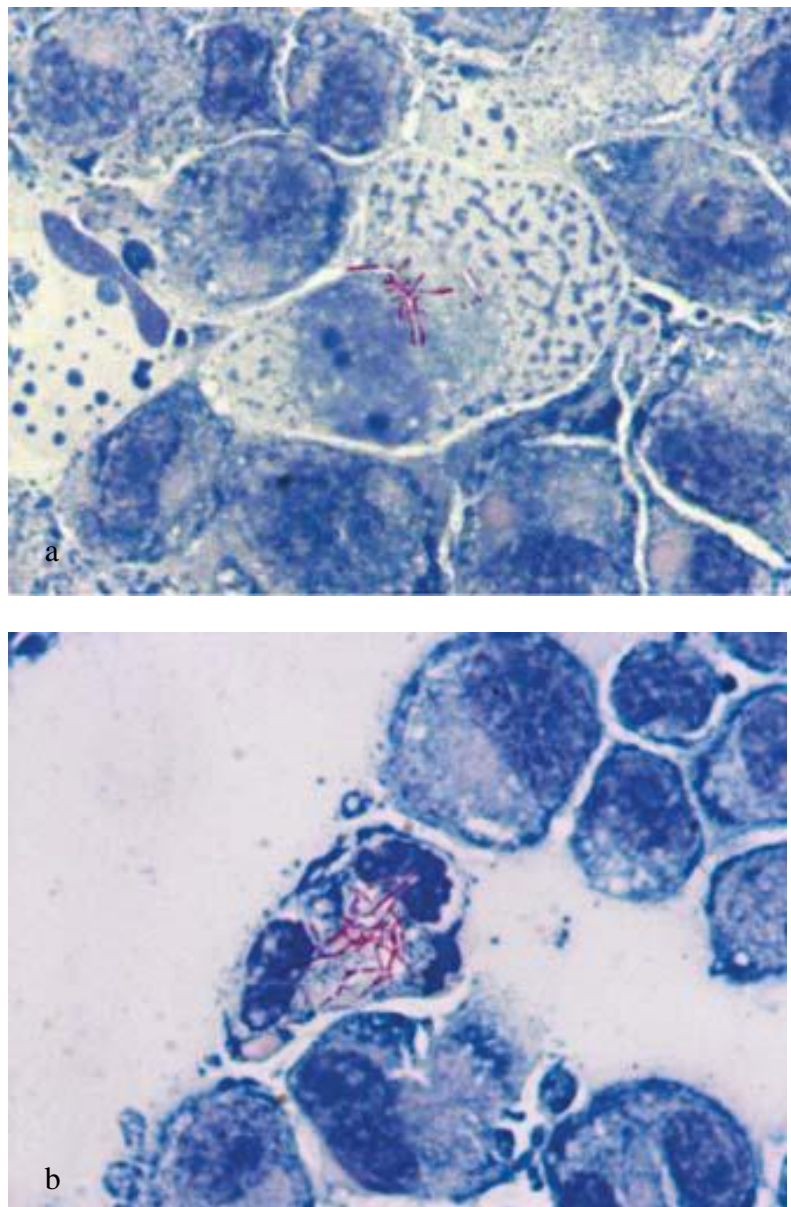


Fig. 5. Infección de monocapa de macrófagos THP-1 con la suspensión unicelular de *N. brasiliensis*. (a) Una hora posterior a la infección se observan pocas células de *Nocardia* dentro de los fagocitos (100X). (b) Seis horas posteriores a la infección, la monocapa aún se encuentra intacta con un número mayor de células de *Nocardia* dentro de los fagocitos (100X).

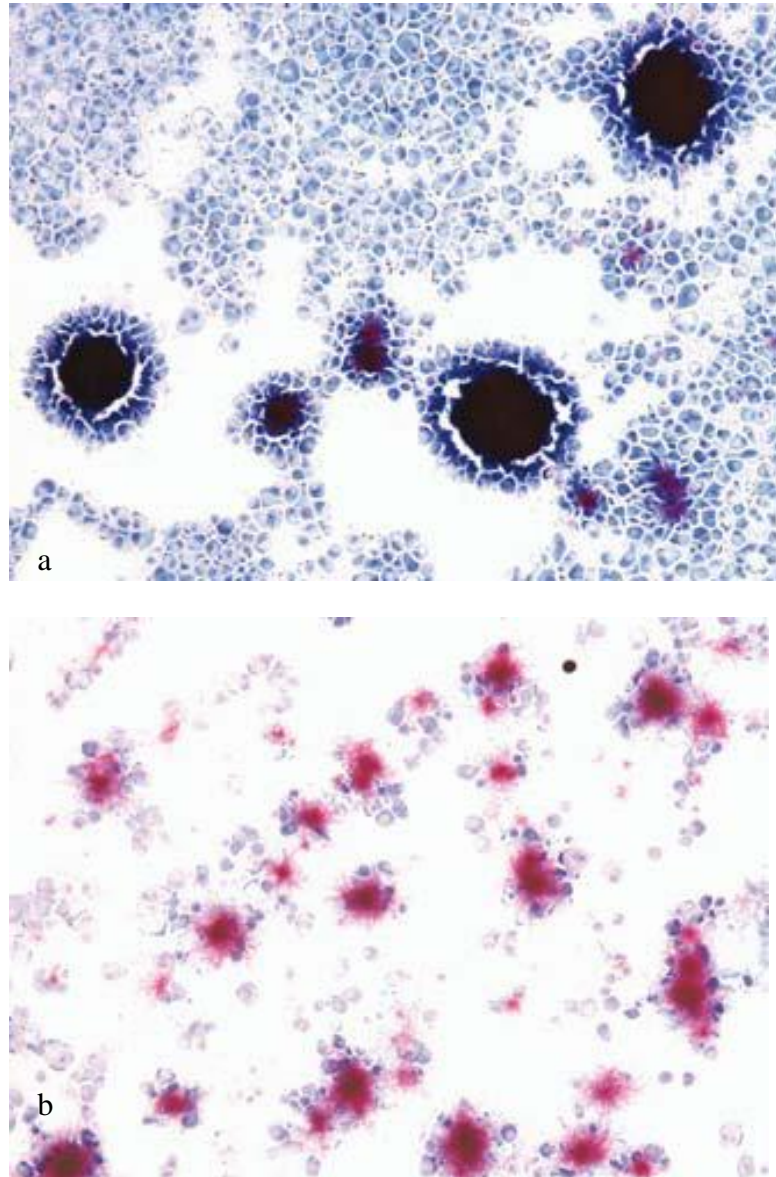


Fig. 6. Infección de monocapa de macrófagos THP-1 con la suspensión unicelular de *N. brasiliensis* (a) A las 12 horas después de la infección se observa la producción de acúmulos de *Nocardia* con destrucción de la periferia de la monocapa. 10X (b) A las 24 horas después de la infección, la mayor parte de la monocapa ha sido destruida. 10X.

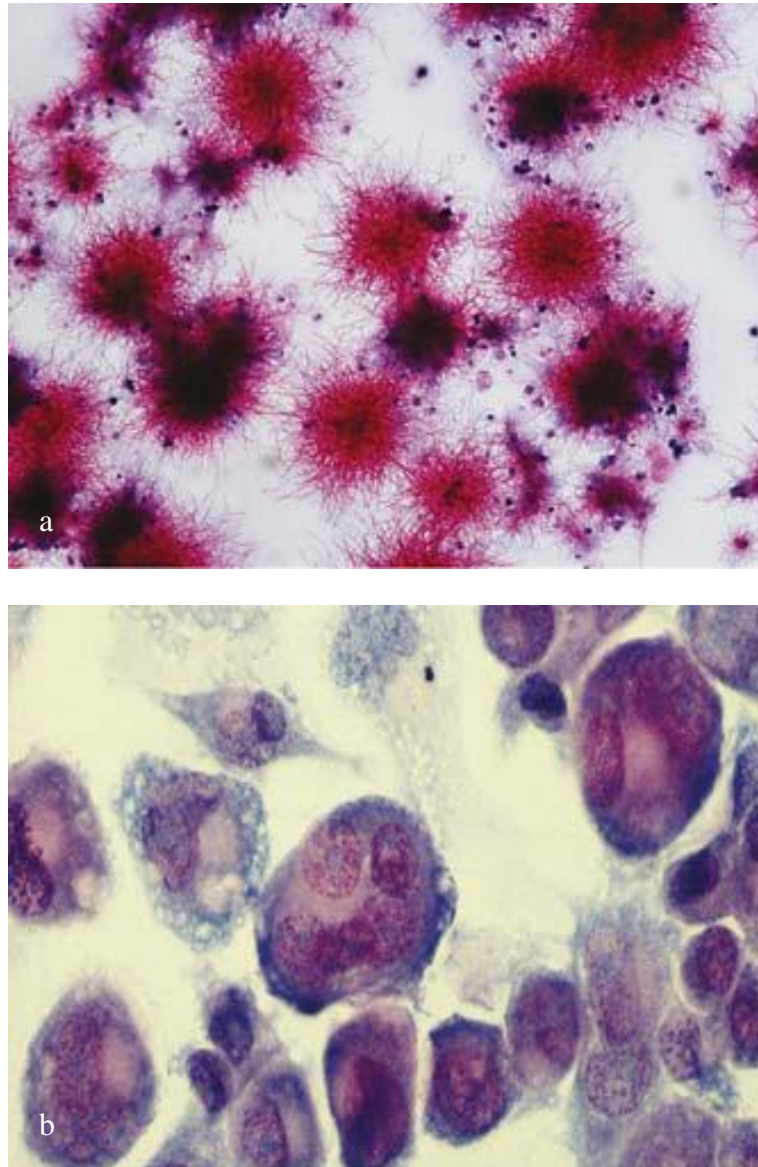


Fig. 7. Infección de monocapa de macrófagos THP-1 con la suspensión unicelular de *N. brasiliensis*. (a) A las 48 horas después de la infección, se observaron acúmulos de filamentos intensamente teñidos acompañados de escasos macrófagos.10X (b) A las 12 horas después de la infección, la infección por *Nocardia* induce a la fusión de macrófagos y la producción de células multinucleadas. 60X.

En la Fig. 8 se puede observar una disposición lineal en relación al incremento en el número de UFC de *N. brasiliensis*. Sin embargo después de 1.8×10^6 se pierde la linealidad a pesar de aumentar la cantidad de UFC.

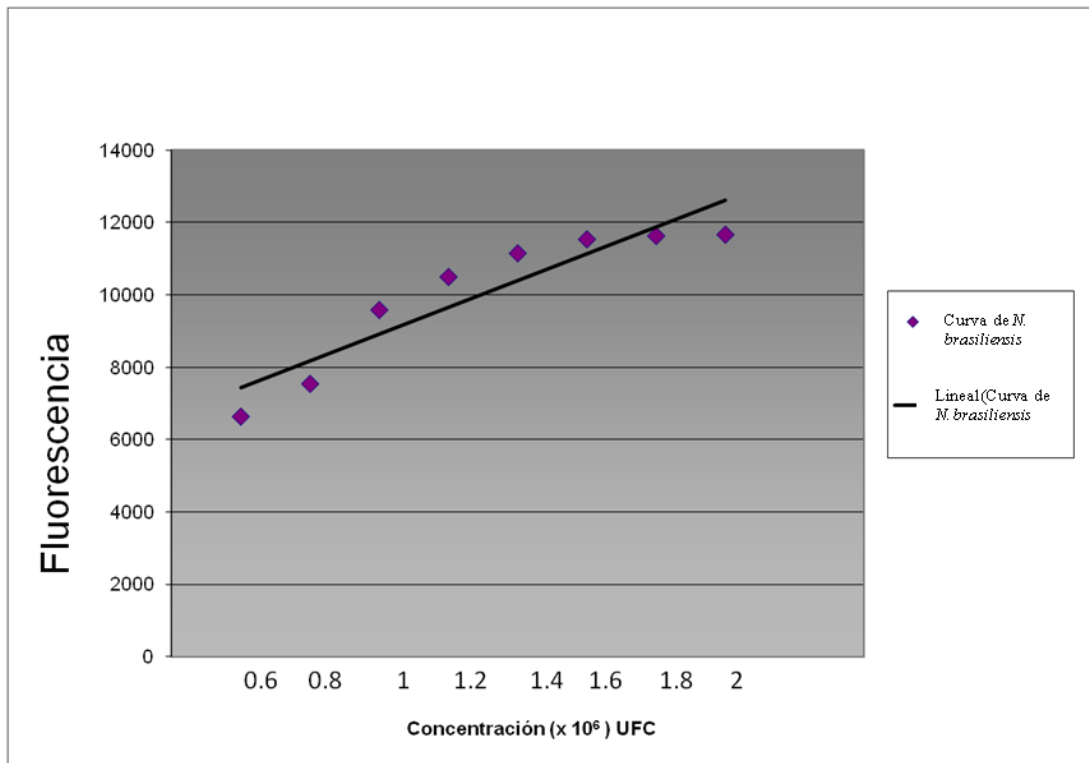


Fig. 8. Cuantificación de células de *N. brasiliensis* con Azul alamar por Fluorescencia. La gráfica contiene los datos desde 0.6 a 2×10^6 UFC de *N. brasiliensis* HUJEG-1(ATCC 700358) en intervalos de 0.2×10^6 , entre cada punto.

Una vez establecida la curva con Azul Alamar, se realizó el modelo de infección de la monocapa de macrófagos cuantificando la cantidad de *Nocardia brasiliensis* tanto por UFC como por Fluorescencia.

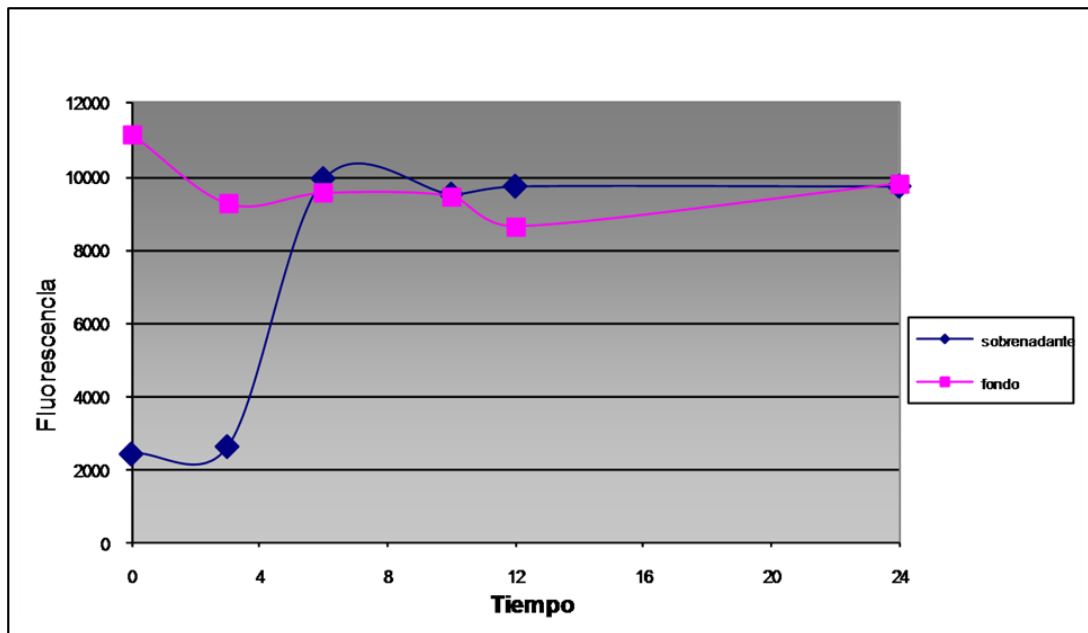


Fig. 9. Gráfica de cuantificación de sobrenadante y fondo del ensayo de infección de *N. brasiliensis* en monocapa de macrófagos THP-1 (Relación 3:1).

Se observa *N. brasiliensis* ◆ en el sobrenadante y ■ fondo.

En la figura 9 se puede observar los datos obtenidos al cuantificar el fondo y el sobrenadante a los diferentes tiempos del ensayo de infección de la monocapa de macrófagos THP-1 con *N. brasiliensis* 3:1.

Con los resultados previos, se puede observar que es a las 6 hrs cuando hay un mayor número de crecimiento bacteriano, tanto en el fondo como en el sobrenadante.

Con dicha observación se determinó que será a las 6 hrs el tiempo idóneo para valorar la actividad del medicamento en estudio, después de las 2 horas previas de infección.

3. Determinación del efecto de DA-7157 y DA-7218 sobre macrófagos infectados con *Nocardia brasiliensis*

Una vez establecido el modelo previamente presentado, se utilizaron los medicamentos en estudio: DA-7157 y DA-7218 además de linezolid. Se utilizó un control infectado con *N. brasiliensis* y un control sin infectar.

Se aplicó el mismo método de cuantificación (Azul Alamar) para determinar la respuesta tras la infección en macrófagos al agregar los diversos antimicrobianos.

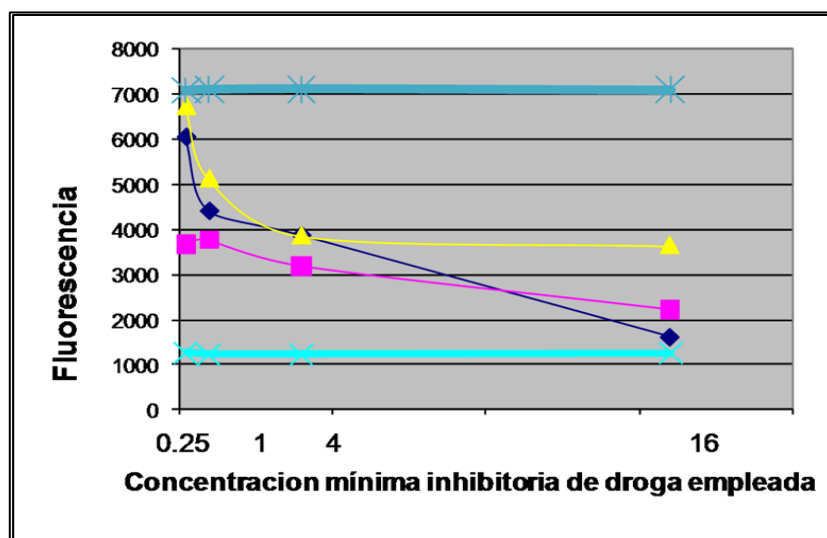


Fig. 10. Concentración de *N. brasiliensis* en monocapa de macrófagos THP-1 + Oxazolidinonas. Evaluación con Azul alamar por Fluorescencia. Se utilizaron DA-7218(◆) DA-7157 (◻) linezolid (▲) Control sin infectar (*), Control infectado (+).

En la Fig. 10 es posible observar el comportamiento de la monocapa de macrófagos THP-1 frente a la infección al añadirle los medicamentos en sus diferentes dosis. Se observó una disminución notoria en los grupos tratados con DA-7218 (77%) y DA-7157 (69%), con respecto al control negativo e inclusive mejor que linezolid (49%) como control positivo.

A pesar de que linezolid tiene una CMI menor que DA- 7157 y DA-7218, *ex vivo*, el comportamiento es diferente. La pro-droga, DA-7218, reduce la cantidad de infección comparándose con los datos obtenidos en el control no infectado.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con la prueba de Kruskal-Wallis ANOVA de una vía (P : 0.003363, **Fig. 11**).

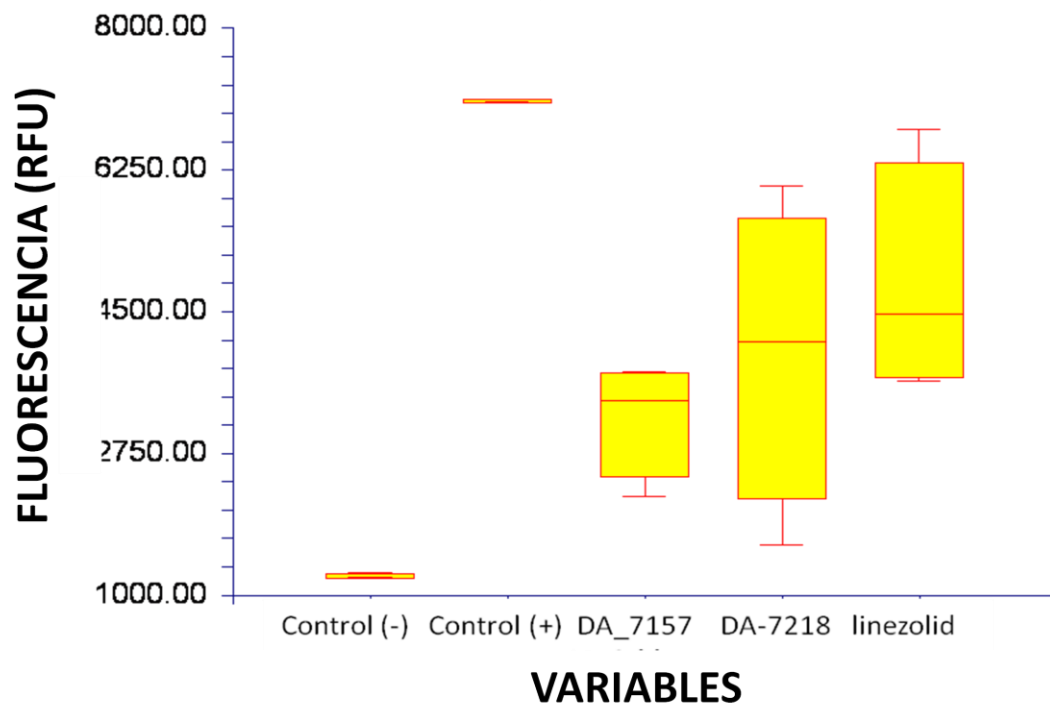


Fig. 11. Evaluación con prueba de Kruskal-Wallis ANOVA de una vía. Grafica de caja (Boxplot). Medición en RFU, Unidades de emisión de Fluorescencia Relativa

Hipótesis, H_0 : Todas las medianas son iguales. , H_a : Al menos 2 medianas son diferentes. P : 0.003363. Con lo anterior se rechaza H_0

Evaluación estadística empleando la prueba de Dunnet de 2 lados, comparación múltiple con control.

Respuesta: Control negativo, Control positivo, DA-7157, DA-7218, linezolid

Term A: Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=15 MSE=1179991 Critical Value=2.7276

Si el grupo control es:	Media (RFU)	Diferencia entre grupos tratados
Control negativo	1241	DA-7218, linezolid, Control positivo
DA-7157	3208.375	Control positivo
DA-7218	3995.125	Control negativo, Control positivo
linezolid	4842	Control negativo, Control positivo
Control positivo	7106.5	Control negativo, DA-7157, DA-7218, linezolid

Tabla 4. Evaluación estadística empleando la prueba de Dunnet de 2 lados, comparación múltiple con control.

Es posible observar que hay diferencia entre los grupos que recibieron tratamiento comparados con el control positivo. Sin embargo no se observa diferencia entre DA-7157 y el control negativo.

Evaluación estadística empleando la prueba de Dunnet con intervalos de confianza simultáneos. Control Negativo

Respuesta: Control negativo, Control positivo, DA-7157, DA-7218, linezolid

Term A: Control Group: Control negativo

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=15 MSE=1179991 Critical Value=2.7276

Tratamiento	Media (RFU)	Inf. 95.0% I.C. Simult.	Diferencia con el control	Sup 95.0% I.C. Simult.	Resultado
Control positivo	7106.5	3770.419	5865.5	7960.582	U
DA-7157	3208.375	-127.7064	1967.375	4062.456	
DA-7218	3995.125	659.0436	2754.125	4849.207	U
Linezolid	4842	1505.919	3601	5696.082	U

Tabla 5. Evaluación estadística empleando la prueba de Dunnet con intervalos de confianza simultáneos. Control Negativo Se observa que hay diferencia entre los grupos del control positivo, DA-7218 y Linezolid comparado con el control negativo. Pero no hay diferencia entre el grupo DA-7157 y el control negativo.

Evaluación estadística empleando la prueba de Dunnet con intervalos de confianza simultáneos. Control positivo

Response: Control negativo, Control positivo ,DA-7157, DA-7218, linezolid

Term A: Control Group: Control positivo

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=15 MSE=1179991 Critical Value=2.7276

Tratamiento	Media (RFU)	Inf 95.0% I.C. Simult.	Diferencia con el control	Sup 95.0% I.C. Simult.	Resultado
Control negativo	1241	-7960.582	-5865.5	-3770.419	L
DA-7157	3208.375	-5993.207	-3898.125	-1803.044	L
DA-7218	3995.125	-5206.457	-3111.375	-1016.294	L
Linezolid	4842	-4359.582	-2264.5	-169.4186	L

Tabla 6. Evaluación estadística empleando la prueba de Dunnet con intervalos de confianza simultáneos. Control positivo. Se observa que hay diferencia entre los todos los grupos: del control negativo, DA-7157, DA-7218 y linezolid comparado con el control positivo.

4. Determinación de las concentraciones plasmáticas de DA-7218 y DA-7157 en ratones BALB/c:

En la figura 12 podemos observar que DA-7218 en concentraciones de 5, 12.5 y 25 mg/kg logra rebasar la CMI de *N. brasiliensis* HUJEG-1(ATCC 700358)(1µg/ml). En la dosis de 25 mg/kg, 20 min después de su administración subcutánea, DA-7218 está completamente desfosforilado a DA-7157 (**Fig. 12 y 14**). Posterior a ese tiempo DA-7218 prácticamente desaparece y su metabolito, DA-7157, alcanza su *Cmax* a las 4 h (**Fig. 13 y 14**).

Los niveles plasmáticos a dosis de 25 y 12.5 mg/kg permanecen aun por encima de la CIM₉₀ de la cepa de *N. brasiliensis* HUJEG-1(ATCC 700358) (1 µg/mL) inclusive 10 horas después de su aplicación. Al usar 5 mg/kg, se observó una disminución en las concentraciones plasmáticas de DA-7157 con niveles alrededor de 1µg/mL.

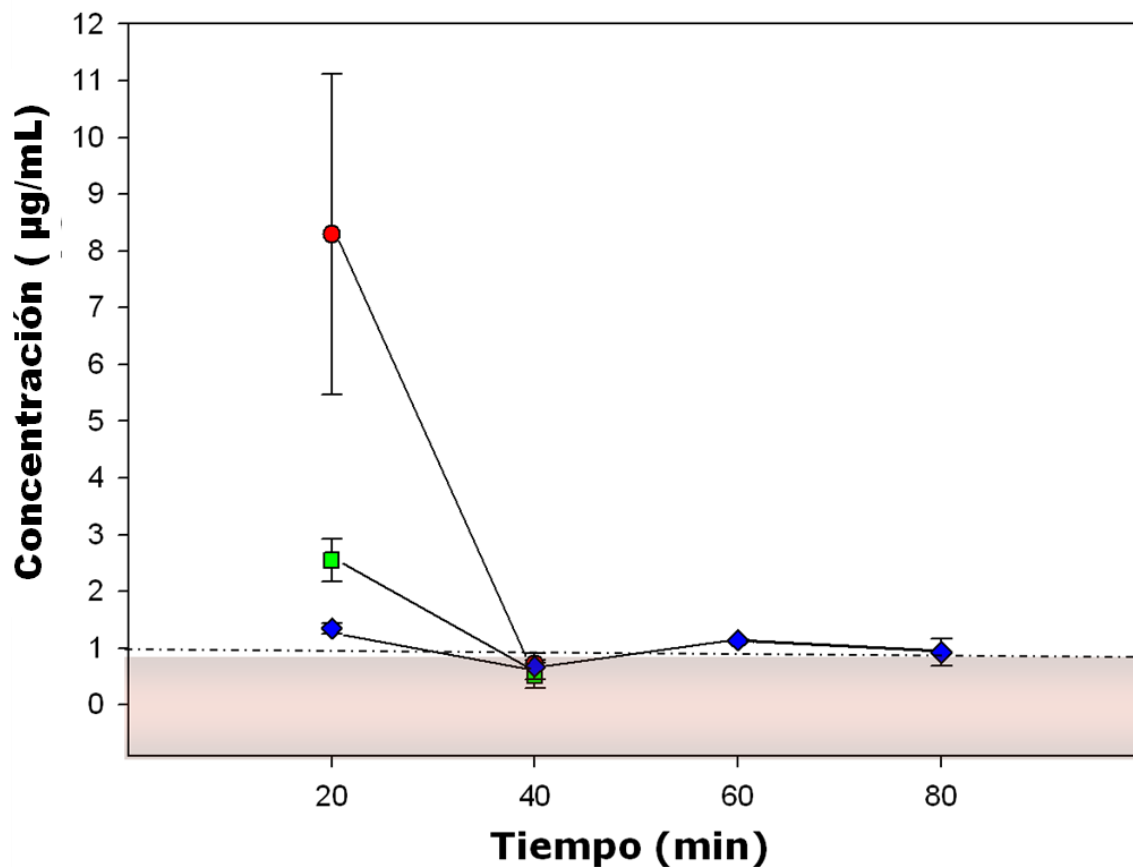


Fig.12. Concentración plasmática de DA-7218 en ratones BALB/c. Después de 40 minutos esta pro-droga se convierte en el compuesto activo DA-7157 y ya no es posible detectarla en sangre. Cada punto representa 3 ratones. Las barras representan la desviación estándar. El ● representa DA-7218 a 25mg/kg, el ■ representa DA-7218 a 12.5mg/kg, el ◆ representa DA-7218 a 5mg/kg.

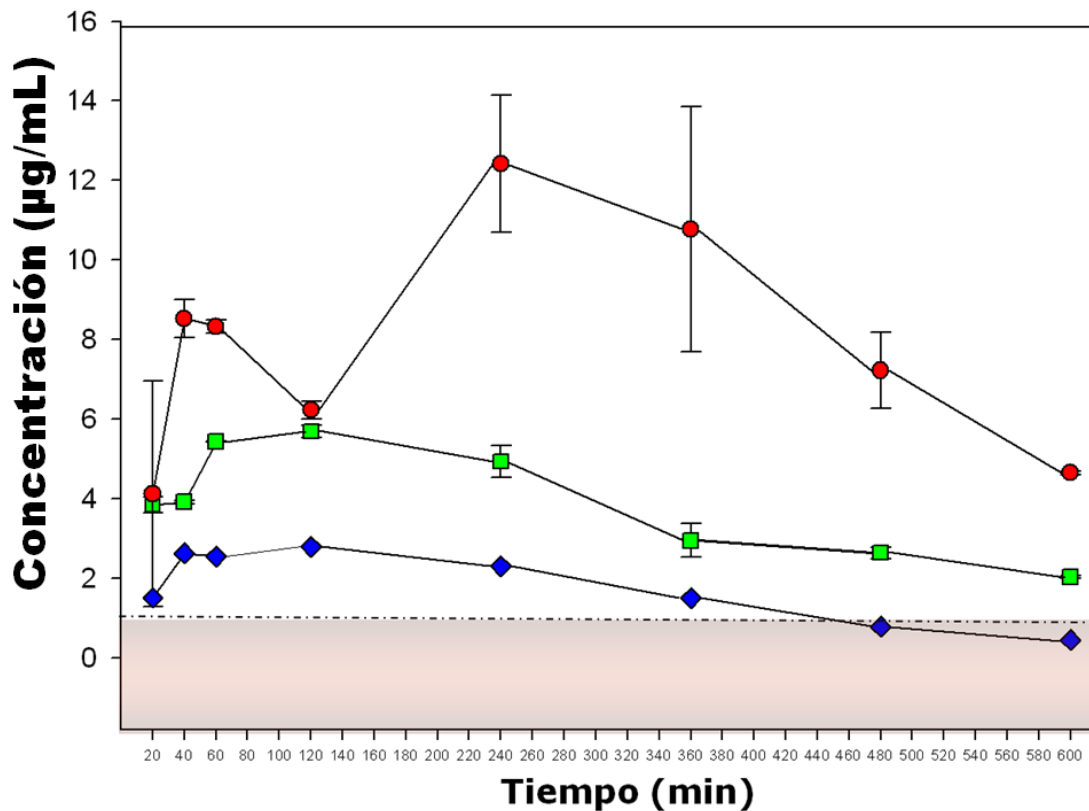


Fig. 13. Concentración plasmática de DA-7157 en ratones BALB/c. A partir de los 20 min. de la administración de DA-7218, es posible detectar DA-7157, manteniéndose por encima de la CMI inclusive después de 10 horas de su administración. Cada punto representa 3 ratones. Las barras representan la desviación estándar. El ● representa DA-7157 a 25mg/kg, el ■ representa DA-7157 a 12.5mg/kg, el ◆ representa DA-7157 a 5mg/kg.

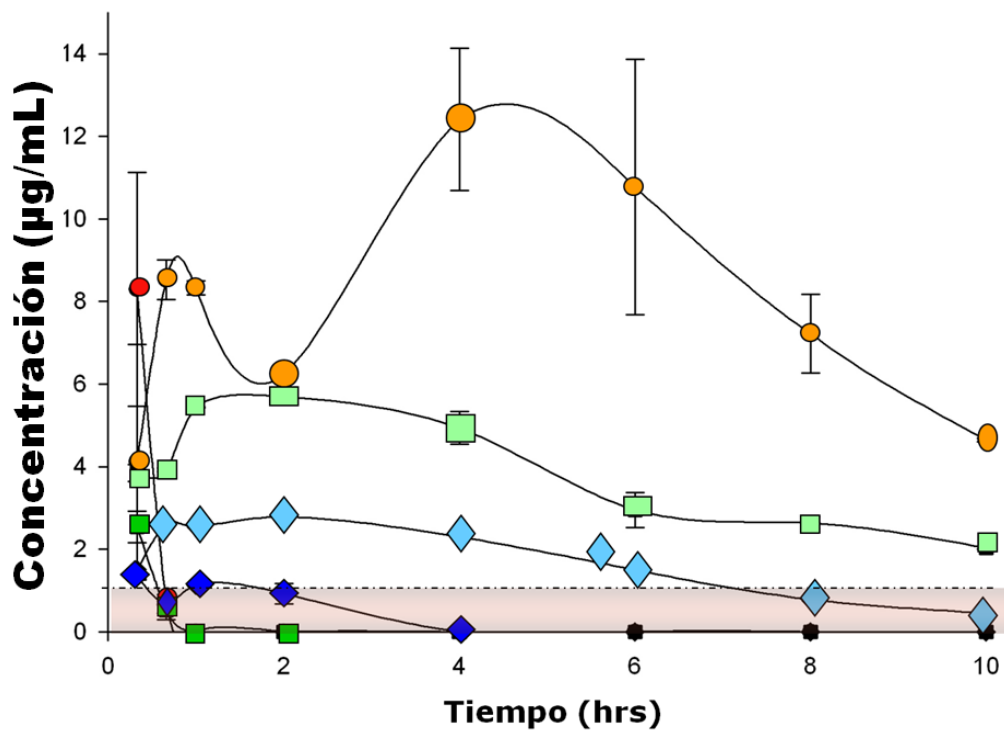


Fig. 14. Concentración plasmática de DA-7157 y DA-7218 en ratones BALB/c.

Se administró DA-7218 y al poco tiempo (20 min) es posible observar DA-7157, la sustancia activa, en sangre, manteniéndose por encima de la CMI inclusive 10 horas después de su administración a concentración de 25 y 12.5mg/kg. Cada punto representa 3 ratones. Las barras representan la desviación estándar. El ● representa DA-7218 a 25mg/kg, el ■ representa DA-7218 a 12.5mg/kg, el ◆ representa DA-7218 a 5mg/kg. El ● representa DA-7157 a 25 mg/kg, el ■ representa DA-7157 a 12.5 mg y el ◆ representa DA-7157 a 5 mg/kg.

5. Ensayos *in vivo* en ratones infectados con *Nocardia brasiliensis*
HUJEG-1(ATCC 700358)

PRIMER ENSAYO TERAPÉUTICO

En el primer ensayo, después de tres semanas de tratamiento en base a la evaluación realizada empleando la escala de medición (**Fig. 15**), se observó (**Fig. 16**) que el grupo tratado con 25mg/kg de DA-7218 tuvo mejor respuesta terapéutica que los otros grupos tratados con 12.5 y 5mg/kg de DA-7218. Estas diferencias estadísticamente significativas se observaron más claramente en todos los grupos al finalizar el segundo ciclo de tratamiento de tres semanas (**Fig. 17**), aun en el grupo de 5 mg/kg de la pro-droga ($P < 0.001$, **Fig. 18**). En el grupo recibiendo 25 mg/kg, la mayoría de los animales presentaron lesiones de menos de 1+, y muchos de ellos eran negativos. Estos resultados correlacionan con los resultados obtenidos en plasma por DA-7157, ya que los niveles de 25 mg/kg sobrepasaban el CMI⁹⁰ y se mantenían arriba de él más de 10 hrs lo que resulta en una respuesta clínica excelente. Los niveles plasmáticos menores correlacionan con una menor actividad *in vivo*, como en la dosis de 5 mg/kg.

Al final del primer ciclo del primer ensayo se observó una tendencia favoreciendo a los grupos que recibieron DA-7218 en mayor concentración, comparado con el grupo recibiendo solución salina. Sin embargo fue hasta el final del segundo ciclo del primer ensayo en que la mejoría fue más evidente (**Fig. 17**).

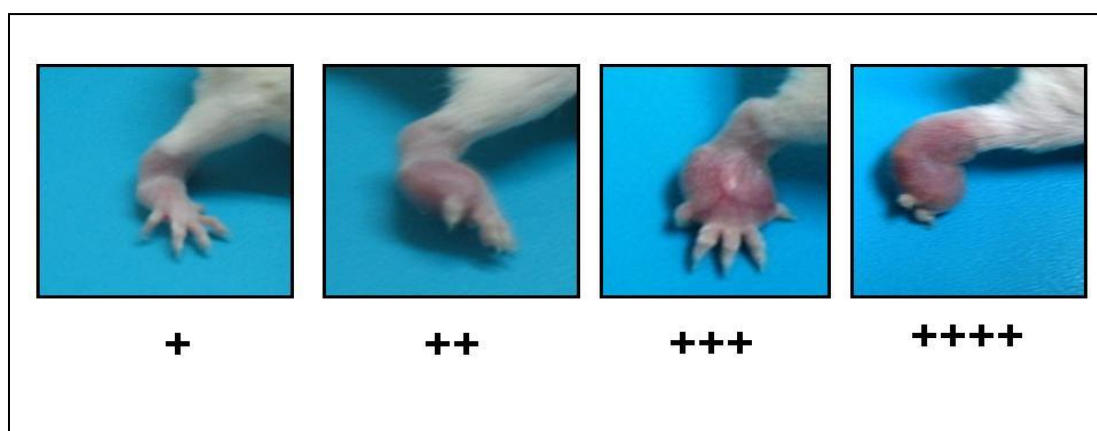


Fig.15. Escala para medición de lesiones producidas por *N. brasiliensis* en el **modelo experimental murino**. Las lesiones en las patas de los ratones se basaron en el grado de extensión, en una escala de 0 (representa ausencia de lesiones) hasta 4 cruces en el caso de que la inflamación sea severa y se extienda por encima del metatarso.

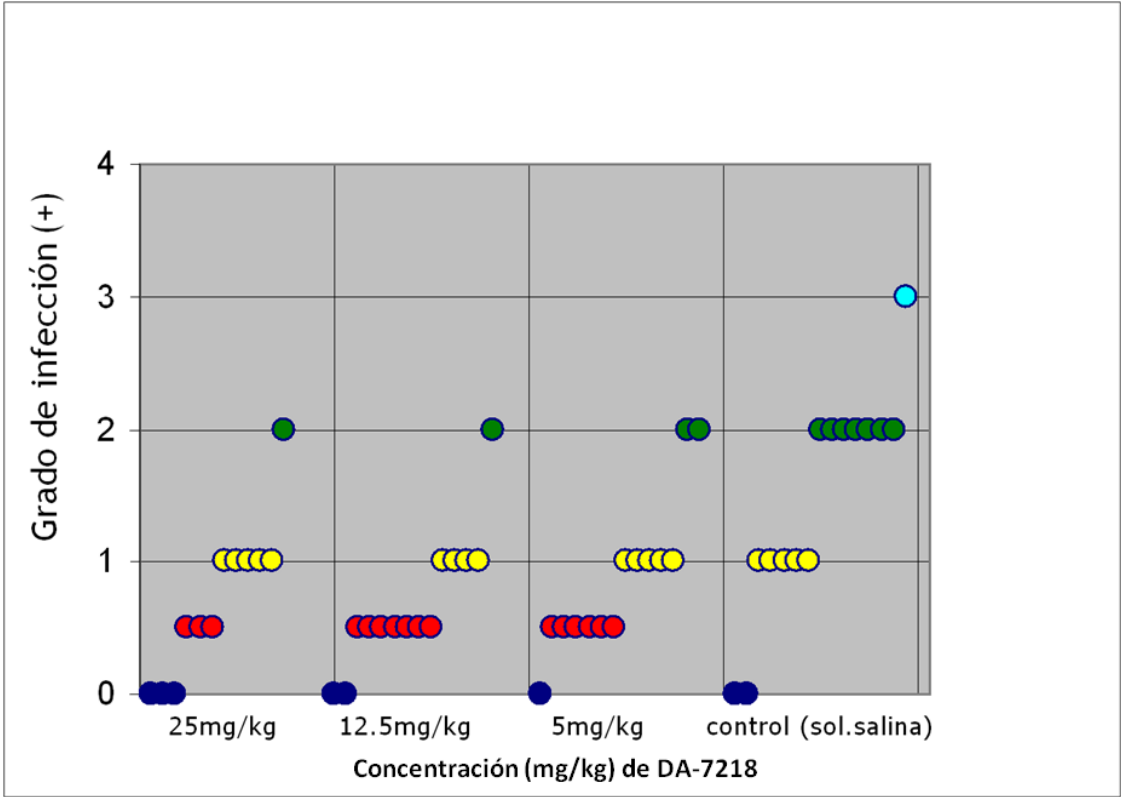


Fig.16. Evaluación al final del 1er ciclo de ensayo en ratones BALB/c. Cada punto representa la evaluación del cojinete plantar de un ratón.

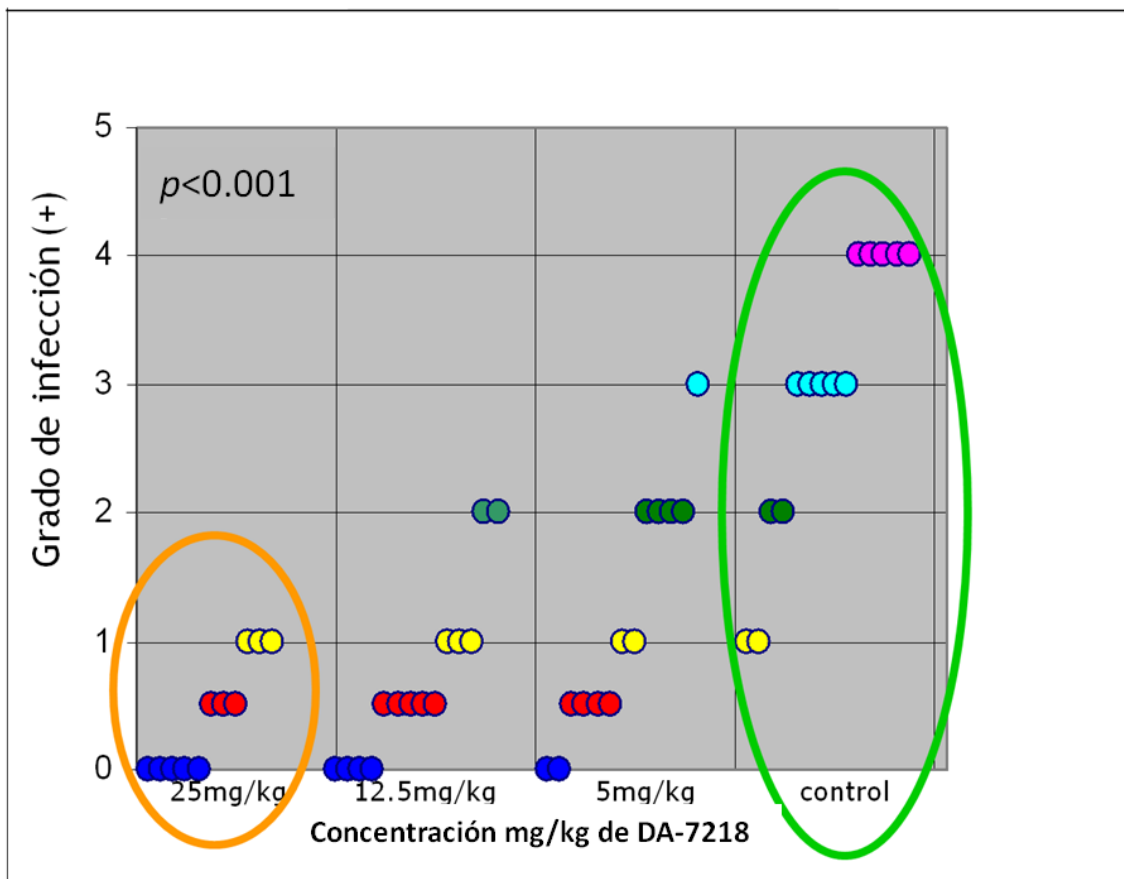


Fig. 17. Evaluación final del 2do ciclo de ensayo, 1er ensayo en ratones

BALB/c. Cada punto representa la evaluación del cojinete plantar de un ratón.

Los resultados obtenidos fueron evaluados para ver si existen diferencias entre los grupos de tratamiento y el control, mediante la Prueba de medianas de Mood. Esta es una prueba no paramétrica equivalente a ANOVA, con muestras independientes aleatorias para poblaciones con distribuciones en formas similares, con mediciones repetitivas.

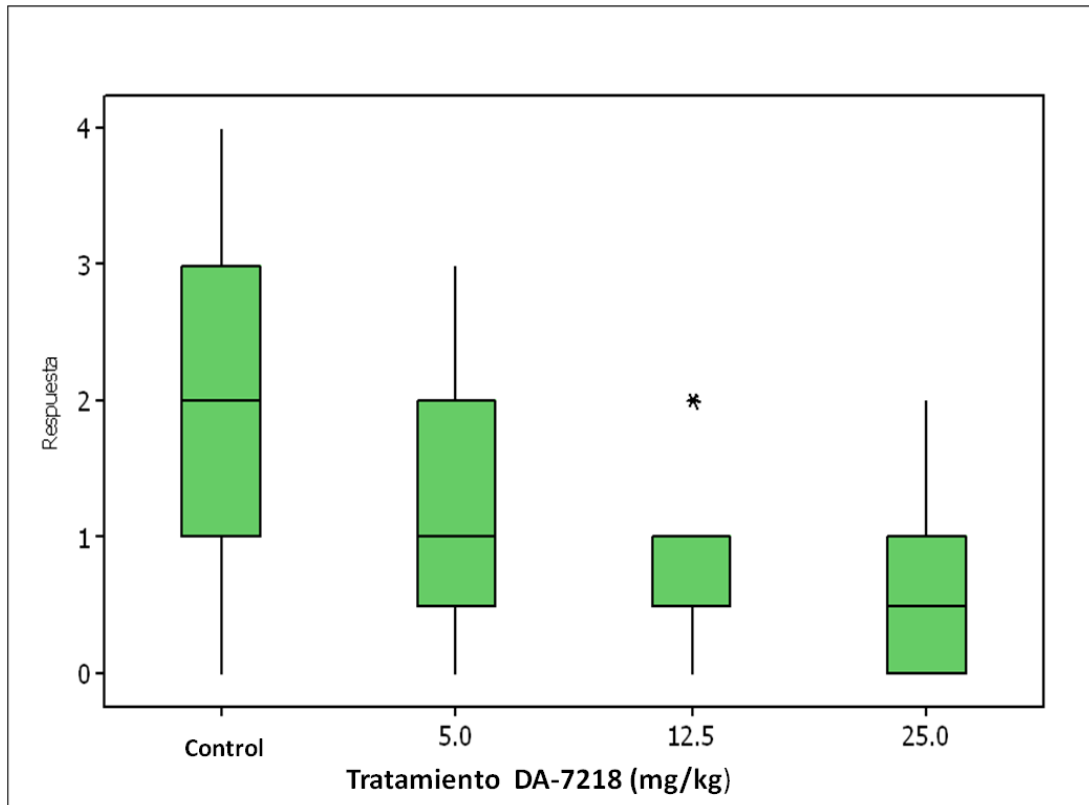


Fig.18. Gráfica en cajas (Boxplot) del primer ensayo terapéutico. Prueba de Dunnett. En esta gráfica podemos comparar la media de cada grupo con la del grupo control. * Datos fuera de rango. Ho = las medianas de las dosis son iguales. Ha = al menos una mediana es diferente. $P < 0.001$

Con esta prueba se confirma que hay diferencias estadísticamente significativas entre el control y las tres dosis. El control es el que tiene los valores de infección más altos. Las tres dosis son estadísticamente iguales. El tratamiento a Las dosis a 5 y 12.5 mg/kg tienen intervalos de mejora iguales. La dosis de 25 mg/kg tiene un intervalo más amplio, es decir produjo una mejora significativa.

SEGUNDO ENSAYO TERAPÉUTICO: COMBINACIÓN DE DA-7128 + SXT

En este ensayo fue posible observar la diferencia de los grupos recibiendo los medicamentos comparados con el grupo control desde el primer ciclo (**Fig. 19**), sin embargo la diferencia fue notoria al final del segundo ciclo de tratamiento en los grupos recibiendo DA-7218 a 25 mg/kg and DA-7218 a 25 mg/kg + SXT. Los resultados fueron evaluados usando la prueba de Medianas de Mood.

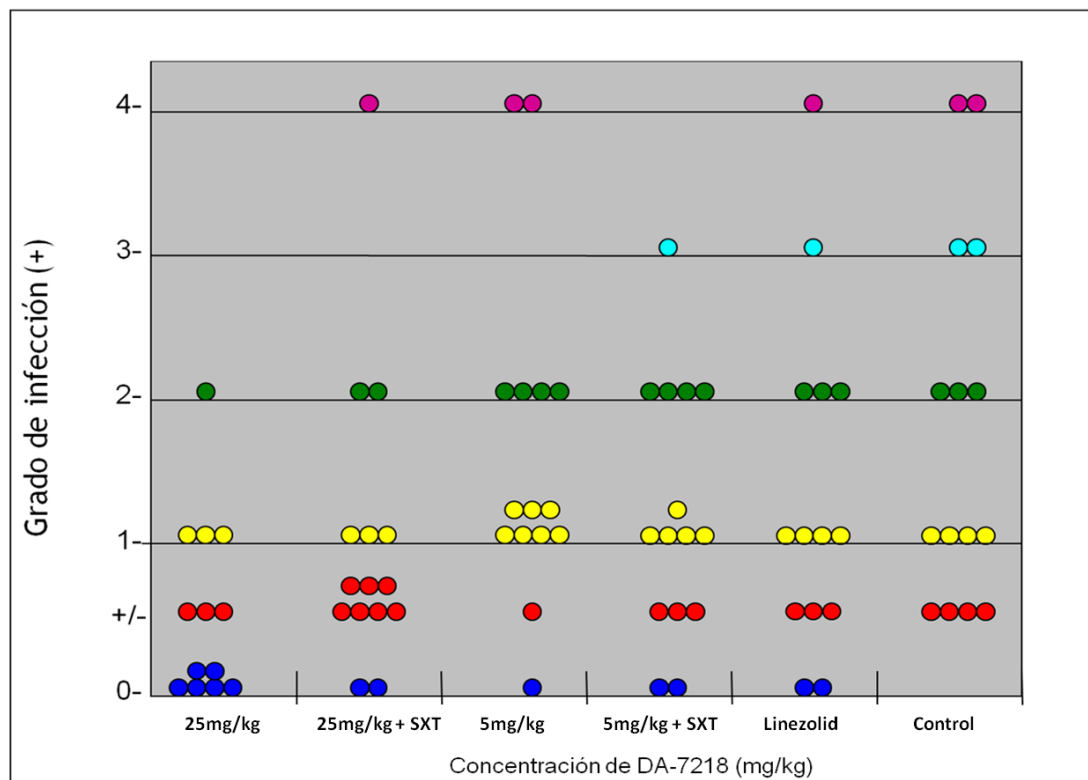


Fig. 19. Evaluación posterior al primer ciclo (tres semanas) de tratamiento combinado de DA-7218 + SXT, en ratones BALB/c. Cada punto representa la evaluación del cojinete plantar de un ratón.

Las diferencias encontradas son estadísticamente significativas entre los grupos empleando oxazolidinonas, sin embargo, las dosis a 25 mg/kg sola y combinada con SXT son estadísticamente iguales y poseen intervalos de mejora muchos más altos que los otros grupos ($P < 0.004$).

En estos 2 grupos más del 80% de los ratones tuvieron una respuesta de 0+ (**Fig.15, Fig. 20**). También se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.024$) entre el grupo que recibió linezolid y el grupo control. En el resto de los grupos hubo una disminución gradual en la respuesta directamente relacionada con la dosis de oxazolidinonas que recibieron en comparación con el grupo control (**Fig. 21**).

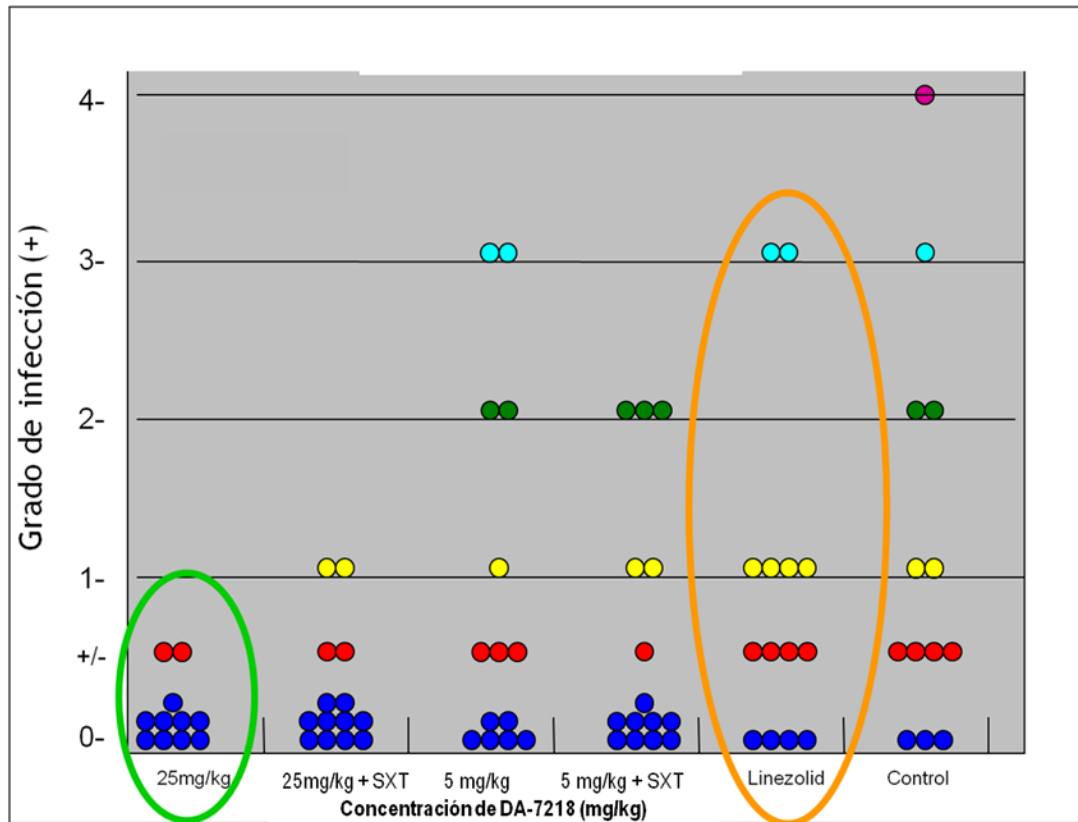


Fig. 20. Evaluación posterior al segundo ciclo de tratamiento combinado de DA-7218 + SXT, en ratones BALB/c. Cada punto representa la evaluación del cojinete plantar de un ratón.

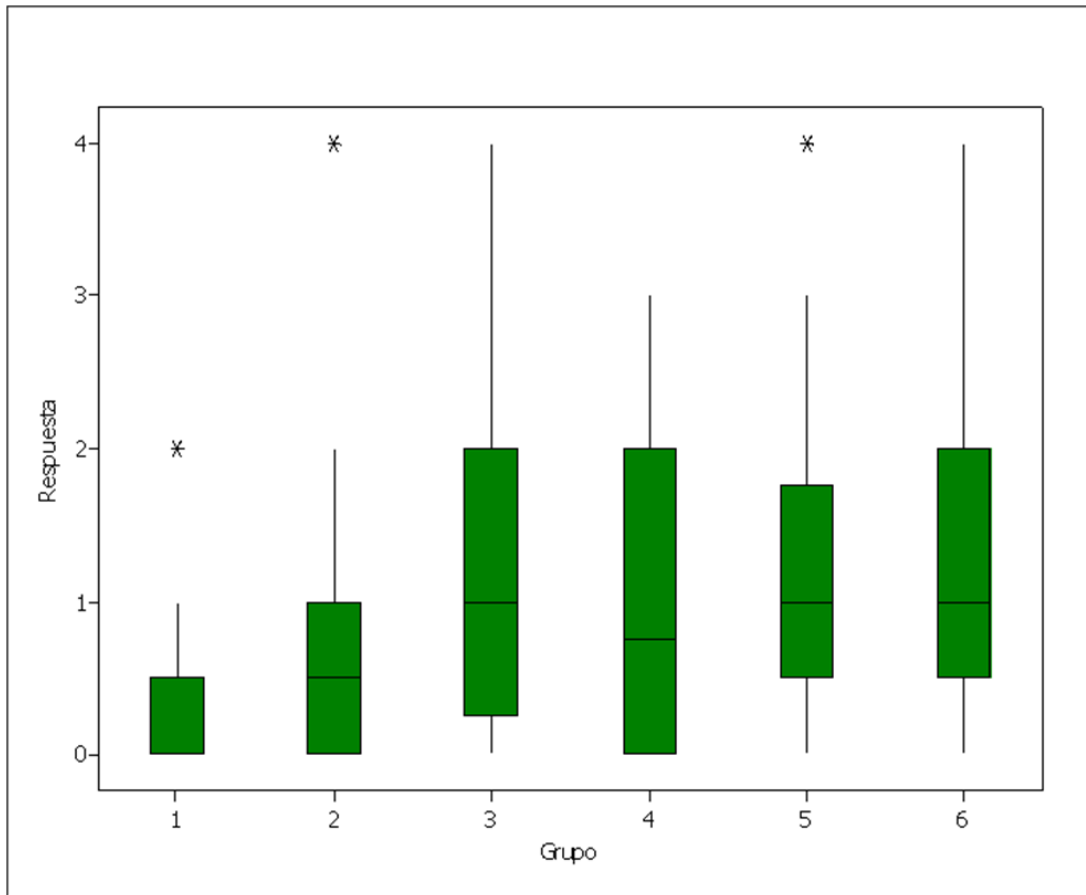


Fig. 21. Gráfica de cajas (Boxplot) de los resultados al final del tratamiento combinado de DA-7218 + SXT, en ratones BALB/c. Cada barra indica la distribución de los datos (25 – 75%) usando valores mínimos y máximos. Cada línea dentro de las barras representa la mediana. Existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos recibiendo oxazolidinonas y el grupo control.

* Datos fuera de rango.

Ho = las medianas de los grupos son iguales

Ha = al menos una mediana es diferente

P= 0.004 De los grupos recibiendo tratamiento vs grupo control

DISCUSIÓN

El actinomicetoma es una lesión tumoral con múltiples abscesos y fístulas. Los agentes etiológicos se pueden encontrar como micro-colonias, aunque también se pueden encontrar cantidades más pequeñas como microorganismos intracelulares. Existen pocos esquemas terapéuticos exitosos para tratar esta enfermedad, esto puede ser debido al hecho de que in vitro, pocos antibióticos pueden alcanzar el nivel óptimo de concentración tisular o a la falta de actividad para matar a la bacteria tanto intra como extracelularmente.

En la actualidad no existen muchas alternativas para el tratamiento del actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*. Los más comúnmente utilizados, SXT y su combinación con amikacina no son 100% efectivos y en algunas ocasiones pueden producir efectos adversos tales como síndrome de Stevens- Johnson, hipoacusia y/o neurotoxicidad.

Debido a que estos antimicrobianos deben ser tomados por largos períodos de tiempo, es muy importante la adherencia al tratamiento para evitar la aparición de resistencia. La mayoría de los pacientes con micetoma son de escasos recursos, con bajo nivel educativo y viven en áreas rurales alejadas de los hospitales y les es difícil atenderse.

Las oxazolidinonas podrían ser son una alternativa terapéutica de reciente desarrollo. De éstas, linezolid es la única disponible en el mercado desde el 2001. Su uso ha sido principalmente en infecciones severas causadas por bacterias Gram positivas así como en casos resistentes a otros antimicrobianos o en infecciones de piel, tejidos blandos y neumonía.

En humanos, en dosis de 600 mg vía oral alcanza una C_{max} de 13.1 $\mu\text{g/mL}$ y los niveles se mantienen por encima de $3.25 \pm 1.02 \mu\text{g/mL}$ por 12 horas (90). Se ha observado que tiene actividad contra organismos de difícil manejo como *Nocardia* y *Mycobacterium tuberculosis* (52). Se ha utilizado satisfactoriamente por periodos cortos inclusive en pacientes con insuficiencia renal o trastornos hepáticos. Los efectos secundarios más comúnmente reportados son cefalea, náusea y diarrea. Sin embargo, su uso por tiempos prolongados ha sido asociado con eventos adversos serios como mielosupresión y trombocitopenia si es usado por 2 semanas o más. Sí se usa por un tiempo mayor a este, se ha reportado neuropatía periférica, la cual puede ser irreversible, daño del nervio óptico y acidosis láctica, todo esto debido a toxicidad mitocondrial (41).

El linezolid ha sido utilizado eficazmente en el tratamiento de algunos casos de nocardiosis subcutánea (52). En el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José E. González”, se trató a un paciente inmuno-comprometido, que presentaba nocardiosis subcutánea de la pierna, con diseminación hacia abdomen y formación de grandes abscesos retroperitoneales (97). La infección fue causada por una cepa clínicamente resistente a amikacina, SXT y amoxicilina-ácido

clavulánico. El tratamiento fue exitoso al emplear linezolid a dosis de 600 mg cada 24 horas por un período de 3 meses. Por lo anterior, aunque esta oxazolidinona es eficaz en el tratamiento de infecciones en humanos, es necesario que contemos con oxazolidinonas que fueran menos tóxicas y más potentes. Estos datos nos alentaron a seguir investigando nuevas opciones para casos resistentes de actinomicetoma. En estudios previos *in vitro* se observó que cepas de *Nocardia spp.* y *Actinomadura madurae* han mostrado ser susceptibles a antimicrobianos que no habían sido utilizados en pacientes con micetoma, incluyendo nuevas oxazolidinonas como DA-7867, DA-7157 y DA-7218 (13)

Existen pocos estudios acerca del crecimiento de *Nocardia* dentro de macrófagos, la mayoría de éstos emplearon *Nocardia asteroides* tipo 6 (ahora denominada *Nocardia cyriacigeorgica*).

Beaman and Smathers (6-7) utilizaron macrófagos alveolares de conejos para estudiar la infección con cepas de *N. asteroides* y describieron cómo la respuesta de los macrófagos estaba relacionada a la virulencia del organismo, la cepa altamente virulenta fue capaz de inducir una respuesta dramática en los macrófagos que secuencialmente resultó en la formación de agregados celulares, aparición de células gigantes redondas y multi-nucleadas, y con la consecuente destrucción de la monocapa con la producción de acúmulos de *Nocardia* flotando en el medio de cultivo. Dichos hallazgos son similares a los encontrados en nuestro estudio al emplear una relación de 3:1.

Por tradición se le ha considerado a las especies que en el pasado pertenecían al grupo de *N. asteroides* menos virulentas que *N. brasiliensis*, ya que las primeras principalmente causan enfermedades en pacientes inmuno-comprometidos; sin embargo, parece ser que los mecanismos de defensa de respuesta inmune innata presentan un comportamiento similar ante ambas especies.

Beaman y Smathers (7) también se percataron de las limitantes que representaba la cuantificación de *N. brasiliensis* usando el método de dilución en agar ya que los acúmulos flotantes representaban sólo una colonia. Debido a que deseábamos cuantificar el efecto de las oxazolidinonas en el crecimiento de *Nocardia*, se desarrolló un ensayo respirométrico, basado en lo previamente publicado para *Staphylococcus aureus* (72). El Azul Alamar es un compuesto que al reducirse fluoresce. Cuando cuantificamos el crecimiento de *Nocardia* usando la cuantificación de la suspensión unicelular, el método pudo determinar desde 0.2×10^6 hasta 2×10^6 UFC.

Las oxazolidinonas han mostrado eficacia in vitro. DA- 7867 parecía muy prometedora debido a que sus valores de CMI eran menores a aquellos encontrados para linezolid ($0.03 \mu\text{g/mL}$) (87). Sin embargo, no se observó su potencia al realizar el ensayo experimental en ratones. Por el contrario, DA-7157 mostró un mejor efecto, inhibiendo la producción de lesiones extensas y la mayoría de los animales estaban prácticamente curados (27). Con linezolid se observó un efecto más modesto. Esto puede estar relacionado con la actividad intracelular de estos compuestos, ya que DA-7157 es más activo que linezolid. La excelente actividad

antimicrobiana intracelular observada, sugiere que estos compuestos pueden ser muy efectivos en el tratamiento del actinomicetoma, sin embargo se requieren estudios clínicos para confirmarlo y determinar su seguridad terapéutica.

Bae *et al.* determinaron la farmacocinética de DA-7218 en ratas Sprague-Dawley usando 5, 10 y 20 mg/kg administrados por vía intravenosa (IV) y oral (VO) (4). En ambos casos se observaron niveles plasmáticos de DA-7218 de menos de 1 $\mu\text{g/mL}$ después de 30 min de aplicación. Con respecto a la dosis de 20mg/kg, posterior a las 8 hrs de su aplicación IV, las concentraciones de DA-7157 eran de aproximadamente 0.5 $\mu\text{g/mL}$. En su administración VO las concentraciones se mantuvieron altas después de 12 horas y en la dosis de 20 mg/kg, las concentraciones arteriales fueron de aproximadamente 7 $\mu\text{g/mL}$.

En nuestro modelo en ratones BALB/c a una dosis de 25 mg/kg se produjeron niveles plasmáticos de DA-7157 de aproximadamente 6 $\mu\text{g/mL}$ a las 10 h. Se puede observar que la administración VO, como la del estudio de Bae et al, produce niveles plasmáticos similares a los observados en ratones BALB/c usando la vía subcutánea (SC).

DA-7157 ha demostrado ser más activa que linezolid contra diversos microorganismos Gram positivos incluyendo *S. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* meticilino -resistente, entre otras (43). Ambos comparten CMI90 contra *N. brasiliensis* (1 $\mu\text{g/mL}$). Sin embargo al comparar la actividad de linezolid contra DA-7218 en modelo experimental en ratones BALB/c, este último produce mejores

resultados deteniendo el desarrollo de las lesiones en los animales y en contraste con linezolid en el grupo tratado con DA-7218 muchos animales no presentaban lesión alguna. Si este efecto pudiera observarse en pacientes, se necesitarían tiempos más cortos de tratamiento para obtener remisión completa de la enfermedad.

Se prefieren las terapias antimicrobianas combinadas debido al posible efecto sinérgico entre las drogas empleadas y para evitar el desarrollo de cepas naturalmente resistentes (84). Debido a que la terapia para el actinomicetoma por *N. brasiliensis* debe de ser empleada por meses, se requieren además compuestos menos tóxicos.

Las oxazolidinonas como DA-7218, DA-7867 y linezolid, se encuentran dentro de los nuevos antimicrobianos evaluados frente a *N. brasiliensis* (36, 84, 87). Ellos han mostrado actividad *in vitro* frente al 100% de las cepas probadas (36, 87). Estudios previos han evidenciado que linezolid y DA-7218 son efectivas en el tratamiento del actinomicetoma en su modelo experimental en ratones (19, 36), pero DA-7218 ha demostrado una mayor y mejor actividad comparada con la mostrada por linezolid. SXT también presentó resultados positivos comparados con el grupo control en modelo experimental de actinomicetoma en ratones (87).

En teoría la combinación de 2 opciones terapéuticas útiles como DA-7218 y SXT podrían proveer de una mejor respuesta en el tratamiento del modelo experimental de actinomicetoma en ratones; Sin embargo nuestros resultados no mostraron ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos recibiendo DA-7218 solo o en combinación con SXT.

Recientemente se han identificado varias especies patógenas Gram positivas con CIM elevado (≥ 8 mg/L) para linezolid e.g. *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa negativa y *Streptococcus viridians* (9, 84-85). Esta resistencia ha sido asociada a los cambios genéticos en el gen 23S rRNA, lo cual afecta de uno a cuatro sitios de nucleótidos (9, 69). Algunas de estas mutaciones puntuales también se han encontrado en algunas cepas de laboratorio (87). Al comparar la tasa de mutación de *S. aureus* ATCC 29213 (susceptible a meticilina) con linezolid y DA-7157 (TR-700 o Torezolid, Trius Therapeutics, San Diego, CA) se puede observar una diferencia de un exponente (1.9×10^{-9} en linezolid y 1.2×10^{-10} para DA-7157 (TR-700) (9, 68, 71). Éste último compuesto ha mantenido su actividad inclusive en mutantes inducidos por linezolid, demostrando que no hay reacción cruzada entre ambos antimicrobianos. Fue sólo cuestión de unos años para que comenzara a aparecer resistencia a linezolid; basados en la ausencia de reacción cruzada, pudiéramos esperar que tomara mayor tiempo para que aparezcan los mutantes naturales de DA-7157 (TR-700).

Debido a lo expuesto anteriormente consideramos importante el uso de terapia combinada en nuestro estudio para así evitar el desarrollo de mutantes naturales.

DA-7218 (TR-701) aún es un medicamento en estudio. Trius Therapeutics ha desarrollado recientemente una extensa investigación que involucra esta nueva

oxazolidinona en modelos en ratones contra cepas de *Enterococcus* y *Staphylococcus* resistentes a linezolid y a meticilina - (SAMR) incluyendo el modelo de inhalación de ántrax en ratones. En estos estudios concluyeron que DA-7218 fue entre 4 y 32 veces más activa que linezolid contra estafilococos y enterococos y que supera la mayoría de las resistencias a linezolid, particularmente para los organismos que permanecen heterocigotos para G2576T, que es la mutación más comúnmente encontrada en aquellos resistentes a linezolid (4, 56).

Es sabido que las oxazolidinonas inducen efectos hematológicos reversibles dependientes de tiempo y dosis. Debido a los resultados *in vitro* e *in vivo* en modelos experimentales en ratones, que demuestran que esta oxazolidinona es generalmente 6 veces más eficaz que linezolid, Trius desarrolló un estudio Fase 1 de 21 días.

Para poder maximizar los posibles efectos de DA-7218 y linezolid en parámetros hematológicos, se condujo el estudio comparando los dos antimicrobianos y placebo en sujetos sanos. Cada cohorte (8 activos y 2 placebos) recibían dosis diarias de 200, 300 ó 400 mg DA-7218 (TR-701), o 600 mg de linezolid 2 veces al día.

Entre los resultados de este estudio, se observó que en las dosis probadas para TR-701 o linezolid no se observaron cambios significativos en los parámetros hematológicos al final de los primeros 7 días. La dosis de 200 mg QD era comparable al placebo al final del estudio, mientras que la dosis de 300 mg QD tuvo efectos mínimos en el conteo plaquetario y la dosis de 400 mg QD tuvo efectos

comparativos al uso de linezolid 600mg BID. Para ambos antimicrobianos, la principal línea celular afectada fueron las plaquetas. Los cambios en las plaquetas generalmente aparecieron entre los días 9 y 12 del estudio, para posteriormente estabilizarse durante la tercera semana, sin mostrar mayor disminución. Con esto se concluyó que a las dosis probadas en un periodo de tratamiento de 5 a 7 días no se produce alteración hematológica alguna, además de que provee una alternativa terapéutica mejorada para el tratamiento de infecciones Gram-positivas (9).

Trius Therapeutics también desarrolló estudios de farmacocinética en humanos. En un estudio emplearon DA-7218 (TR-701) en dosis de 200 y 400 mg vía oral observando que alcanzaban una concentración plasmática de 1mg/L (para la CMI₉₀ de *N. brasiliensis*) la cual se mantenía por 10 h (55), planteando la posibilidad de utilizar esta droga a dosis bajas (200 mg) cada 12 horas para evitar o minimizar los efectos secundarios, pero manteniendo aun su actividad antibacterial. En otro estudio posterior se utilizaron dosis únicas de DA-7218 (TR-701) a 200, 400, 600, 800, ó 1200 mg después de un ayuno de 10hrs. A pesar de haber eventos adversos, estos se consideraron leves y sólo el 50% se relacionó con la toma del medicamento. Se reportaron un número semejante en cada cohorte y el mayor número de eventos adversos se relacionaron con la administración de 200mg de TR-701. Los eventos reportados fueron náuseas, mareo y congestión nasal. No hubo eventos adversos serios, muertes ni discontinuación en el estudio debido a los eventos adversos (EA). No hubo cambios ni hallazgos clínicamente significativos en los signos vitales, electrocardiograma (ECG) ni exploración física. No hubo una dosis respuesta relacionada al número de EA y en general los cambios fueron

insignificantes. Con lo anterior se concluyó que TR-701 VO es segura y bien tolerada en voluntarios sanos en dosis únicas de hasta 1200 mg (60).

En otro estudio similar empleando las mismas dosis, se observó, al igual que en los realizados por nosotros, que DA-7218 (TR-701) es rápidamente convertida en DA-7157 (TR-700) (9), datos que también se habían demostrado en estudios previos de farmacocinética en ratas (4). Las concentraciones plasmáticas observadas en el estudio, eran por encima de la CIM 90 (0.5µg/ml) para enterococos vancomicina-resistentes y SAMR por un promedio 15.3 hrs a 200 mg, y mayor de 24 hrs en dosis por encima de 400 mg. Se concluyó que se puede utilizar el régimen de TR-701 una vez al día satisfactoriamente (9).

Recientemente se han desarrollado estudios fase 2, de dosis variadas, aleatorizado y doble ciego, en pacientes con infecciones de la piel y sus anexos severamente complicadas (40) a 200, 300 y 400 mg PO QD. Los resultados mostraron tasas de curación de 95.7 % y 96.9% en *S. aureus* meticilino-sensible y SAMR, respectivamente. Se concluyó que todas las dosis investigadas fueron igualmente efectivas y que administrado por un periodo de 5-7 días es seguro y tolerado adecuadamente en todas las dosis evaluadas. Estos datos muestran, en conjunto con los estudios de farmacocinética previamente comentados, que la dosis de 200 mg PO QD es la menos efectiva (40).

El 16 de Junio del 2010, se recibió la aprobación de la FDA para iniciar el diseño de un estudio fase 3 para la administración oral de TR-701 ahora también

llamado fosfato de torezolid en el tratamiento de infecciones bacterianas agudas de la piel y sus anexos.

Los datos expuestos previamente indican que la aplicación a corto plazo de DA-7218 es menos toxica para el paciente que linezolid. Linezolid ha sido probada por largos periodos de tiempos hasta por 30 meses (9, 55) y tan solo unos cuantos pacientes presentaron efectos secundarios. Dado los resultados obtenidos de la aplicación de esta nueva oxazolidinona, es posible que DA-7218 pudiera ser menos toxica que linezolid a tratamientos a largo plazo. Sin embargo, se deberá de probar esto último una vez que esté compuesto este aprobado para su uso en humanos.

Tal como se realizó en nuestros ensayos experimentales con ratones, la posibilidad de realizar esquemas terapéuticos en ciclos en futuro, disminuiría el tiempo de uso de sustancias como las oxazolidinonas, y así se evita la exposición crónica que pudiera desarrollar efectos adversos, como los demostrados por linezolid. En este estudio probamos la combinación de DA-7218 y SXT, el resultado fue muy similar al obtenido con DA-7218 solo, sin embargo el uso de la combinación pudiera prevenir la formación de resistencia.

Los recientes esfuerzos por obtener nuevas y promisorias opciones para el tratamiento de infecciones consideradas crónicas y de difícil manejo como el actinomicetoma se puede considerar que han sido exitosos al obtener estos nuevos antimicrobianos, DA-7157 y su pro-droga, DA-7218.

A lo largo de nuestros experimentos hemos obtenido los resultados esperados al obtener una inhibición del desarrollo de la lesión causada por *N. brasiliensis* en los ratones BALB/c, empleando diferentes dosis de esta nueva alternativa, DA-7218 y dichos resultados fueron confirmados de igual manera al emplear el modelo de infección en macrófagos, lo cual semeja lo que sucede en realidad en el cuerpo humano. Es interesante ver la reacción de los macrófagos frente a la infección activa por *N. brasiliensis* HUJEG-1(ATCC 700358) en sus diferentes tiempos, y aun más como al agregarle esta nueva droga.

Las oxazolidinonas de reciente generación pudieran considerarse como una opción alternativa a los tratamientos actualmente empleados, los cuales aun a pesar de ser efectivos pueden generar resistencia, efectos secundarios indeseables además de ser tratamientos largos y en ciclos. A diferencia de linezolid nuestros estudios demuestran una mayor respuesta frente a *N. brasiliensis* inclusive comparándose con los datos arrojados con el control no infectado. DA-7157 parece haber demostrado su seguridad y efectividad no solo en nuestros estudios sino en los realizados por Trius en diferentes cepas incluyendo aquellas consideradas resistentes a antibióticos de uso convencional en casos difíciles.

Con lo anteriormente mencionado consideramos que estas nuevas oxazolidinonas, DA-7157 y su pro-droga DA-7218, serán una alternativa promisoriosa en el tratamiento de infecciones de difícil manejo como en el actinomicetoma causado por *N. brasiliensis*, una vez que este medicamento se encuentra aprobado para su uso humano.

CONCLUSIONES

1. El modelo de infección de *N. brasiliensis* en macrófagos THP-1 es una nueva manera de evaluar el comportamiento de la infección simulando acción en células humanas.
2. La cuantificación de *N. brasiliensis* por Azul alamar es un método cualitativo/cuantitativo más apegado a la realidad que el previamente establecido por cuentas de UFC.
3. Las oxazolidinonas de nueva generación, como DA-7157 y su pro-droga DA-7218, podrían ser una opción promisoría para el tratamiento del actinomicetoma causado por *N. brasiliensis*.

REFERENCIAS

1. **Ahmed A, D Adelman, A Fahal, H Verbrugh, A van Belkum, S de Hoog.** 2002. Environmental occurrence of *Madurella mycetomatis*, the major agent of human eumycetoma in Sudan. *J Clin Microbiol* **40(3)**:1031-6.
2. **Arenas R.** 2008. *Micología Médica Ilustrada*, 3 ed. Mc Graw Hill, México. México.
3. **Armstrong JA, PD, Hart** 1971. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med.* **1; 134 (3 Pt 1)**713-740.
4. **Bae SK, SH Yang, KN Shin, JK Rhee, M Yoo, MG Lee.** 2007. Pharmacokinetics of DA-7218, a new oxazolidinone, and its active metabolite, DA-7157, after intravenous and oral administration of DA-7218 and DA-7157 to rats. *J Pharm Pharmacol* **59(7)**:955-63.
5. **Barbachyn MR., CW Ford.** 2003. Oxazolidinone structure-activity relationships leading to linezolid. *Angew Chem Int Ed Engl* **9;42(18)**:2010-23.
6. **Beaman BL.** 1977. In vitro response of rabbit alveolar macrophages to infection with *Nocardia asteroides*. *Infect Immun* **15(3)**:925-37.
7. **Beaman BL, M Smathers.** 1976. Interaction of *Nocardia asteroides* with cultured rabbit alveolar macrophages. *Infect Immun* **13(4)**:1126-31.
8. **Beaman BL, AM Sugar.** 1983. *Nocardia* in naturally acquired and experimental infections in animals. *J Hyg* **91 (3)**:393-419.
9. **Bien P, KA Muñoz, J Bohn, R Wright, C Bethune, P Prokocimer.** 2008. Human Pharmacokinetics of TR-700 after ascending single oral doses of the prodrug TR-701, a novel oxazolidinone antibiotic. American Society for Microbiology, DC, USA, 48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, F1-2063. Abstracts of the 48th ICAAC Washington, DC.
10. **Bonifaz A.** 2000. *Micología Médica Básica*, 2 edición. Mendez Editores, Mexico.

11. **Bonifaz A, P Flores, A Saúl, E Carrasco-Gerard, RM Ponce.** 2007. Treatment of actinomycetoma due to *Nocardia spp.* with amoxicillin-clavulanate. *Br J Dermatol* **156(2)**;308-311.
12. **Bonifaz A, G Ibarra, A Saúl, V Paredes-Solis, E Carrasco-Gerard, L Fierro-Arias.** 2007. Mycetoma in children: experience with 15 cases. *Pediatr Infect Dis J* **26(1)**;50-2.
13. **Bozdogan B, PC Appelbaum.** 2004. Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *Int J Antimicrob Agents* **23 (2)**;113-9.
14. **Brown-Elliott BA, SC Ward, CJ Crist, LB Mann, RW Wilson, RJ Jr Wallace.** 2001. In vitro activities of linezolid against multiple *Nocardia* species. *Antimicrob Agents Chemother* **45(4)**;1295-1297.
15. **Cantú, GH** 2004. Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con micetoma en la consulta de Dermatología del H.U., período enero 1990 – diciembre 2003. Tesis. Universidad Autonoma de Nuevo León, Monterrey, N.L.
16. **Cavazos-Rocha N, L Vera-Cabrera, O Welsh-Lozano, N Waksman-de-Torres, M de la Luz Salazar-Cavazos.** 2007. Simultaneous determination and validation of antimicrobials in plasma and tissue of actinomycetoma by high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal* **11;43(5)**;1775-81.
17. **Creamer G, MI Mezence, P Baquero, M Boiron, M Huerre, R Houin.** 1995. Experimental mycetoma due to *Madurella mycetomatis* in non-immunodeficient laboratory mice. *Med Microbiol Lett* **4**;76-82.
18. **Cynamon MH, SP Klemens, CA Sharpe, S Chase.** 1999. Activities of several novel oxazolidinones against *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother* **43(5)**;1189-91.
19. **Chacon-Moreno BE, O Welsh, N Cavazos-Rocha, M de la Luz Salazar-Cavazos, HG Garza-Lozano, S Said-Fernandez, J Ocampo-Candiani, L Vera-Cabrera.** 2009. Efficacy of ciprofloxacin and moxifloxacin against *Nocardia brasiliensis* in vitro and in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Antimicrob Agents Chemother* **53(1)**;295-297.
20. **Chavez G, R Estrada, A Bonifaz.** 2002. Perianal actinomycetoma experience of 20 cases. *Int J Dermatol* **41(8)**;491-3.
21. **Choi SH, T Lee, WB Im, JK Rhee, WB Kim.** 2004. Comparative antibacterial activity of DA-70218, a new oxazolidinone. F-1417. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC, October 30–November 2.

22. **Choi S, T Lee, E Kang, T Son, W Im, J Rhee, W Kim, D Yong, JH Yum, K Lee**. 2004. In Vitro and in vivo antibacterial activity of DA-7218, a new oxazolidinone, against *Staphylococci* and *Enterococci*. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC, Washington, DC, October 30–November 2.
23. **Choi S, T Lee, E Kang, T Son, W Im, J Rhee, W Kim**. 2004. Efficacy of DA-70218, a prodrug of oxazolidinone DA-70157, against penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* in a mouse model of pneumonia. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC, October 30–November 2.
24. **Destombes P, F Mariat, L Rosati, G Segretain**. 1977. [Mycetoma in Somalia - results of a survey done from 1959 to 1964]. *Acta Trop* **34(4)**;355-73.
25. **Diekema DI, RN Jones**. 2000. Oxazolidinones: a review. *Drugs* **59(1)**;7-16.
26. **Dieng, MT, MH Sy, B M Diop, S O Niang, B Ndiaye**. 2003. [Mycetoma: 130 cases]. *Ann Dermatol Venereol* **130 (1 Pt 1)**;16-9.
27. **Espinoza-González NA, O Welsh, NW, de Torres, N Cavazos-Rocha, J. Ocampo-Candiani, S Said-Fernandez, G Lozano-Garza, SH Choi SH, L Vera-Cabrera**. 2008. Efficacy of DA-7218, a new oxazolidinone prodrug, in the treatment of experimental actinomycetoma produced by *Nocardia brasiliensis*. *Molecules* **11; 13(1)**:31-40.
28. **Fahal AH, M Hassan** 1992. Mycetoma. *Br J Surg* 1992 **79(11)**;1138-41.
29. **Ford C, J Hamel, D Stapert, J Moerman, D Hutchinson, M Barbachyn, G Zurenko**. 1999. Oxazolidinones: A new class of antimicrobials. *Infect Med* **16**;435-445.
30. **Ford CW, JC Hamel, DM Wilson, JK Moerman, D Stapert, RJ Yancey Jr, DK Hutchinson, MR Barbachyn, SJ Brickner** 1996. In vivo activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antimicrobial agents, against experimental bacterial infections. *Antimicrob Agents Chemother* **40(6)**1508-13.
31. **Ford CW, J Hammel, D Stapert, JK Moerman, DK Hutchinson, MR Barbachyn, GE Zurenko**. 1997. Oxazolidinones: new antibacterial agents. *Trends Microbiol* **5(5)**;196-200.
32. **Ford CW, GE Zurenko, MR Barbachyn**. 2001. The discovery of linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent. *Curr Drug Targets Infect Disord* **1(2)**;181-199.

33. **Fuentes A, R Arenas, M Reyes, RF Fernández, R Zacarías.** 2006. [Actinomycetoma and *Nocardia spp.* Report of five cases treated with imipenem or imipenem plus amikacin]. *Gac Med Mex* **142(3)**;247-252.
34. **Garlando, F, T.Bodmer, C Lee, W Zimmerli, M Pirovino.** 1992. Successful treatment of disseminated nocardiosis complicated by cerebral abscess with ceftriaxone and amikacin: case report. *Clin Infect Dis* **15(6)**;1039-40.
35. **Gemmell CG.** 2001. Susceptibility of a variety of clinical isolates to linezolid: a European inter-country comparison. *J Antimicrob Chemother* **48(1)**;47-52.
36. **Gomez-Flores A, O Welsh, S Said-Fernández, G Lozano-Garza, RE Tavarez-Alejandro, L Vera-Cabrera.** 2004. In vitro and in vivo activities of antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother* **48(3)**;832-837.
37. **Gonzalez-Ochoa A.** 1969. [Experimental production of mycetoma by *Nocardia brasiliensis* in the mouse]. *Gac Med Mex* **99**;773-81.
38. **Hart PD, JA Armstrong.** 1974. Strain virulence and the lysosomal response in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* **10(4)**;742-746.
39. **Hay RJ, ES Mahgoub, G Leon G, S al-Sogair, O Welsh O.** 1992. Mycetoma. *J Med Vet Mycol* **30 Suppl 1**;41-49.
40. **Surber J, P Mehra, P Manos, J Kingsley, M Mascolo, B Heller, W O’Riordan, R Garcia, P Bien, C De Anda, P Prokocimer.** 2009. Efficacy And Safety Of Torezolid Phosphate (TR-701) In A Dose-Ranging Phase 2 Randomized, Double-Blind Study In Patients With Severe Complicated Skin And Skin Structure Infections (cSSSI), 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abstract L1-335. American Society for Microbiology, San Francisco, CA .
41. **Jodlowski TZ, I Melnychuk , J Conry.** 2007. Linezolid for the treatment of *Nocardia spp.* infections. *Ann Pharmacother* **41(10)**;1694-9.
42. **Lavalle P, MC Padilla, J Pérez Gutiérrez, I Rivera, S Reynoso Rangel.** 2000. Mictomas por *Actinomadura madurae* en Mèxico. *Rev Cent Dermatol Pascua* **9**;19-24.

43. **Lee K, JH Yum, D Yong, Y Chong, SH Choi, JK Rhee.** 2004. Comparative in vitro activity of DA-70157, a novel Oxazolidinone, against recent clinical isolates of aerobic and anaerobic bacteria. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agent and Chemotherapy, Washington, DC, October 30–November 2.
44. **Levites J.** 1990. Micetoma por *Madurella mycetomatis*, estudio de dois pacientes do nordeste brasileiro. Sao Paulo, Sao Paulo. (Tesis mestrado)
45. **Livermore D. M.** 2003. Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. J Antimicrob Chemother **51 Suppl 2**:ii9-16.
46. **López Martínez R, LJ Mendez Tovar, P Lavalle, O Welsh, A Saúl, E Macotela Ruíz.** 1992. [Epidemiology of mycetoma in Mexico: study of 2105 cases]. Gac Med Mex **128(4)**:477-481.
47. **Macotela-Ruiz E, F. Mariat.** 1963. Sur la production de mycetomes experimentaux par *Nocardia brasiliensis* et *Nocardia asteroides*. Bull Soc Pathol Exot **56**:46-54.
48. **Mahgoub, ES** 1973. Mycetomas caused by *Curvularia lunata*, *Madurella grisea*, *Aspergillus nidulans*, and *Nocardia brasiliensis* in Sudan. Sabouraudia **11(2)**:179-82.
49. **Maiti PK, A Ray, S Bandyopadhyay.** 2002. Epidemiological aspects of mycetoma from a retrospective study of 264 cases in West Bengal. Trop Med Int Health **7(9)**:788-92.
50. **Mor N, L Heifets.** 1993. Inhibition of intracellular growth of *Mycobacterium avium* by one pulsed exposure of infected macrophages to clarithromycin. Antimicrob Agents Chemother **37(6)**:1380-2.
51. **Mor N, L Heifets.** 1993. MICs and MBCs of clarithromycin against *Mycobacterium avium* within human macrophages. Antimicrob Agents Chemother **37(1)**:111-4.
52. **Moylett EH, SE Pacheco, BA Brown-Elliott, TR Perry, ES Buescher, MC Birmingham, JJ Schentag, JF Gimbel, A Apodaca, MA Schwartz, RM Rakita, RJ Jr Wallace.** 2003. Clinical experience with linezolid for the treatment of nocardia infection. Clin Infect Dis **1;36(3)**:313-318.
53. **Murray JG, ET Spooner, J Walker.** 1960. Experimental infection of mice with *Madurella mycetomi*. Trans R Soc Trop Med Hyg **54**:335-41.

54. **National Committee for Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2009. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard- Eighth Edition, M07-A8 Vol.29 No. 2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
55. **Prokocimer P, P Bien, K Muñoz, J Bohn, R.Wright, C Bethune.** 2008. Human Pharmacokinetics Of The Prodrug TR-701 And TR-700, Its Active Moiety, After Multiple Oral Doses Of TR-701, A Novel Oxazolidinone p. Abstract F1-2064, p. 311. 48th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology, Washington, DC .
56. **Park IN, SB Hong, YM Oh, MN Kim, CM Lim, SD Lee, Y Koh, WS Kim, DS Kim, WD Kim, TS Shim.** 2006. Efficacy and tolerability of daily-half dose linezolid in patients with intractable multidrug-resistant tuberculosis. *J Antimicrob Chemother* **58(3)**;701-4.
57. **Perronne C, A Gikas, C Truffot-Pernot, J Grosset, JJ Pocidallo, JL Vilde.** 1990. Activities of clarithromycin, sulfisoxazole, and rifabutin against *Mycobacterium avium* complex multiplication within human macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* **34(8)**;1508-11.
58. **Pigrau C.** 2003. [Oxazolidinones and glycopeptides]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **21(3)**;157-164; quiz 165, 169.
59. **Pigrau C, B Almirante.** 2009. [Oxazolidinones, glycopeptides and cyclic lipopeptides]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **27(4)**;236-246.
60. **Prokocimer P, P Bien, KA Muñoz, J Bohn.** 2009. The Safety Of Single Ascending Oral Doses Of TR-701, A Novel Oxazolidinone Prodrug Antibiotic, 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Poster 1090, Helsinki.
61. **Rajavelu P, SD Das.** 2007. A correlation between phagocytosis and apoptosis in THP-1 cells infected with prevalent strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Immunol* **51(2)**;201-10.
62. **Rippon, J.** 1988. Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. WB Saunders , Philadelphia, Pa .
63. **Rodríguez AM, D Sanchez, R Paulino, MC Padilla, A Ramos-Garibay.** 2004 Micetoma podal por *Nocardia brasiliensis*. Reporte de un caso. *Rev. Cent Dermatol Pascua* **13**; 37-40.

64. **Rybak MJ, D Cappelletty, T Moldovan, JR Aeschlimann, GW Kaatz.** 1998. Comparative in vitro activities and postantibiotic effects of the oxazolidinone compounds eperzolid (PNU-100592) and linezolid (PNU-100766) versus vancomycin against *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative *staphylococci*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* **42(3)**;721-724.
65. **Salinas-Carmona MC, E Torres-Lopez, AI Ramos, A Licon-Trillo, D Gonzalez-Spencer.** 1999. Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect Immun* **67(5)**;2428-32.
66. **Salinas-Carmona MC, L Vera-Cabrera L, O Welsh, M Rodríguez.** 1992. Antibody response to *Nocardia brasiliensis* antigens in man. *Zentralbl Bakteriol* **276(3)**;390-397.
67. **Saubolle MA, Sussland D.** 2003. Nocardiosis: review of clinical and laboratory experience. *J Clin Microbiol* **41(10)**;4497-4501.
68. **Schaadt R, D Sweeney, D Shinabarger, G Zurenko.** 2009. In vitro activity of TR-700, the active ingredient of the antibacterial prodrug TR-701, a novel oxazolidinone antibacterial agent. *Antimicrob Agents Chemother* **53(8)**;3236-3239.
69. **Schechter GF, C Scott, L True, A Raftery, J Flood, S Mase.** 2010. Linezolid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Clin Infect Dis* **50(1)**;49-55.
70. **Serrano JA, AA Sandoval.** 2003. El micetoma. revisión. *Rev. Soc. Ven. Microbiol* **23(1)**; 70-79.
71. **Shaw KJ, S Poppe, R Schaadt, V Brown-Driver, J Finn, CM Pillar, D Shinabarger, G Zurenko.** 2008. In vitro activity of TR-700, the antibacterial moiety of the prodrug TR-701, against linezolid-resistant strains. *Antimicrob Agents Chemother* **52(12)**;4442-4447.
72. **Shiloh, MU, J Ruan, C Nathan.** 1997. Evaluation of bacterial survival and phagocyte function with a fluorescence-based microplate assay. *Infect Immun* **65(8)**;3193-8.
73. **Shinabarger DL, K Marotti, RW Murray, AH Lin, EP Melchior, SM Swaney, DS Dunyak, WF Demyan, JM Buysse.** 1997. Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperzolid on translation reactions. *Antimicrob Agents Chemother.* **41(10)**;2132-2136.
74. **Lacaz CS.** 1981. Distribuição Geografica Dos Micetomas No Brasil. *An bras Dermatol* 1981 **56**;167-172.

75. **Slee AM, MA Wuonola, R.J McRipley, I Zajac, MJ Zawada, PT Bartholomew, WA Gregory, M Forbes.** 1987. Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: in vitro and in vivo activities of DuP 105 and DuP 721. *Antimicrob Agents Chemother* **31(11)**;1791-7.
76. **Sood R, M Rao, S Singhal, A Rattan.** 2005. Activity of RBx 7644 and RBx 8700, new investigational oxazolidinones, against *Mycobacterium tuberculosis* infected murine macrophages. *Int J Antimicrob Agents* **25(6)**;464-8.
77. **Ten Broeke R, G Walenkamp.** 1998. The Madura foot: an "innocent foot mycosis"? *Acta Orthop Belg* **64(2)**;242-8.
78. **Theus SA, M Cave, KD Eisenach.** 2004. Activated THP-1 cells: an attractive model for the assessment of intracellular growth rates of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Infect Immun* **72(2)**;1169-1173.
79. **Theus SA, M Cave, KD Eisenach.** 2005. Intracellular macrophage growth rates and cytokine profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different transmission dynamics. *J Infect Dis* **191(3)**;453-460.
80. **Tight RR., MS Bartlett.** 1981. Actinomycetoma in the United States. *Rev Infect Dis* **3(6)**;1139-50.
81. **Tsuchiya S, Y Kobayashi, Y Goto, H Okumura, S Nakae, T Konno, K Tada.** 1982. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res* **42(4)**;1530-1536.
82. **Venkataprasad N, MR Jacobs, JL Johnson, G Klopman, JJ Ellner.** 1997. Activity of new quinolones against intracellular *Mycobacterium avium* in human monocytes. *J Antimicrob Chemother* **40(6)**;841-5.
83. **Vera-Cabrera L, J Castro-Garza, A Rendon, J Ocampo-Candiani, O Welsh, SH Choi, K Blackwood, C Molina-Torres.** 2005. In vitro susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates to garenoxacin and DA-7867. *Antimicrob Agents Chemother* **49(10)**;4351-3.
84. **Vera-Cabrera L, A Daw-Garza, S Said-Fernández, HG Lozano-Garza, NW de Torres, NC Rocha, J Ocampo-Candiani, SH Choi, O Welsh.** 2008. Therapeutic effect of a novel oxazolidinone, DA-7867, in BALB/c mice infected with *Nocardia brasiliensis*. *PLoS Negl Trop Dis* **10; 2(9)**;e289.
85. **Vera-Cabrera L, NA Espinoza-Gonzalez, O Welsh, J Ocampo-Candiani, J Castro-Garza.** 2009. Activity of novel oxazolidinones against *Nocardia brasiliensis* growing within THP-1 macrophages. *J Antimicrob Chemother* **64(5)**;1013-1017.

86. **Vera-Cabrera L, A Gomez.-Flores, WG Escalante-Fuentes, O Welsh.** 2001. In vitro activity of PNU-100766 (linezolid), a new oxazolidinone antimicrobial, against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother* **45(12)**;3629-3630.
87. **Vera-Cabrera L, E Gonzalez, SH Choi, O Welsh.** 2004. In vitro activities of new antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother* **48(2)**;602-604.
88. **Vera-Cabrera L, E Ochoa-Felix, G Gonzalez, T Tijerina, SH Choi, O Welsh.** 2004. In vitro activities of new quinolones and oxazolidinones against *Actinomyces madurae*. *Antimicrob Agents Chemother* **48(3)**;1037-1039.
89. **Vigano SM, A Edefonti, M Ferrareso, ML Ranzi, P Grossi, A Righini, R Rusconi, L Santambrogio, L Ghio.** 2005. Successful medical treatment of multiple brain abscesses due to *Nocardia farcinica* in a paediatric renal transplant recipient. *Pediatr Nephrol* **20 (8)**;1186-8.
90. **Wagenlehner FM, S Wydra, H Onda, M Kinzig-Schippers, F Sörgel, KG Naber.** 2003. Concentrations in plasma, urinary excretion, and bactericidal activity of linezolid (600 milligrams) versus those of ciprofloxacin (500 milligrams) in healthy volunteers receiving a single oral dose. *Antimicrob Agents Chemother* **47(12)**;3789-94.
91. **Welsh-Lozano O, MA Rodríguez, MC Salinas-Carmona, L Vera-Cabrera.**1998. Experimental mycetoma by *N. brasiliensis* in rats . *J Mycol Med* **8**;183-187.
92. **Welsh O.** 1993. Mycetoma. *Semin Dermatol* **12(4)**;290-295.
93. **Welsh O.** 1975. Mycetoma in children. *Mod Probl Paediatr* **17**;248-253.
94. **Welsh O.** 1991 Mycetoma: current concepts in treatment. *Int J Dermatol* **30(6)**;387-398.
95. **Welsh O, E Saucedo, J Gonzalez, J Ocampo.** 1987. Amikacin alone and in combination with trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of actinomycotic mycetoma. *J Am Acad Dermatol* **17(3)**;443-448.
96. **Welsh O, MC Salinas, MA Rodríguez.** 1995. Treatment of eumycetoma and actinomycetoma. *Curr Top Med Mycol* **6**;47-71.
97. **Welsh O, L Vera-Cabrera, MC Salinas-Carmona.** 2007. Mycetoma. *Clin Dermatol* **25(2)**;195-202.

98. **Yew, WW, PC Wong, SY Kwan, CY Chan, MS Li.** 1991. Two cases of *Nocardia asteroides* sternotomy infection treated with ofloxacin and a review of other active antimicrobial agents. *J Infect* **23(3)**;297-302.
99. **Zhao, BY, R Pie, J Domagala, K Drlica.** 1999. Fluoroquinolone action against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: effects of a C-8 methoxyl group on survival in liquid media and in human macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* **43(3)**;661-6.
100. **Zurenko GE, CW Ford, DK Hutchinson, SJ Brickner, MR Barbachyn.** 1997. Oxazolidinone antibacterial agents: development of the clinical candidates eperezolid and linezolid. *Expert Opin Investig Drugs* **6(2)**;151-158.
101. **Zurenko GE, JK Gibson, DL Shinabarger, PA Aristoff, CW Ford, WG Tarpley.** 2001. Oxazolidinones: a new class of antibacterials. *Curr Opin Pharmacol* **1(5)**;470-476.
102. **Zurenko GE, BH Yagi, RD Schaadt, JW Allison, JO Kilburn, SE Glickman, DK Hutchinson, MR Barbachyn, SJ Brickner.** 1996. In vitro activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **40(4)**;839-845.