

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

Facultad de Medicina

Subdirección de Postgrado

PROYECTO DE TESIS que la M.C.P. Brenda Edith Chacón Moreno
presenta como requisito parcial para obtener el grado
de DOCTORADO EN MEDICINA

Título de la propuesta:

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUINOLONAS EN EL MICETOMA
EXPERIMENTAL POR *Nocardia brasiliensis* EN RATONES BALB/c.”

Director de Tesis: Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera

Co-directores de Tesis: Dr. Med. Oliverio Welsh Lozano.
Dr. Jorge Ocampo Candiani

Servicio de Dermatología

Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González

Diciembre del 2010.

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUINOLONAS EN EL MICETOMA
EXPERIMENTAL POR *Nocardia brasiliensis* EN RATONES BALB/c.”

Aprobación de la tesis:



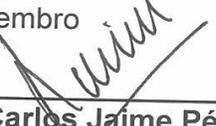
Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera
Director de la tesis



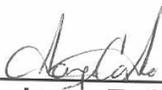
Dr. med. Oliverio Welsh Lozano
Miembro



Dr. C. Noemi Waksman de Torres
Miembro



Dr. med. Jose Carlos Jaime Pérez
Miembro



Dr. C. Jorge E. Castro Garza
Miembro

Dr. med. Juan O. Galindo Galindo
Subdirector de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Título del Estudio: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUINOLONAS EN EL MICETOMA EXPERIMENTAL POR *Nocardia brasiliensis* EN RATONES BALB/c.

Número de páginas: 62

Candidato para el grado de Doctorado en Medicina

Propósito y Método del Estudio: El micetoma es una infección crónica que afecta piel, tejido celular subcutáneo, hueso y en ocasiones órganos adyacentes. Esta caracterizado por aumento de volumen, con presencia de lesiones de aspecto nodular y fístulas con un exudado purulento que contiene los gránulos formados por las colonias del agente causal. Existen actualmente varias opciones de tratamiento para estos pacientes, pero con el posible desarrollo de efectos colaterales indeseables como afectación de la función renal o pérdida de la función auditiva. Por esto es importante tratar de encontrar otras alternativas terapéuticas para estos pacientes, con una posología más cómoda y con disminución o ausencia de los efectos colaterales mencionados. En este trabajo estudiaremos el efecto de algunos medicamentos de la familia de las quinolonas sobre *Nocardia brasiliensis*, tanto *in vitro*, como *ex vivo* e *in vivo*.

Contribuciones y Conclusiones: En este estudio observamos que la gatifloxacina y la moxifloxacina son activas contra *Nocardia brasiliensis in vivo*, *ex vivo* y en el modelo experimental murino. Sera necesario realizar estudios en pacientes para determinar su utilidad en el tratamiento del micetoma causado por *Nocardia brasiliensis*.

FIRMA DEL ASESOR: _____

DEDICATORIA

Dedico este trabajo primeramente a mi esposo Daniel, el cual ha estado conmigo durante todo el proceso y desarrollo de este protocolo. Me ha ayudado tanto en mi área de desarrollo profesional, como en lo personal. Siempre ha estado a mi lado apoyándome en mis decisiones y mi trabajo, es mi compañero para toda la vida. También les dedico este trabajo a mis hijos, que aunque pequeños son mi motor para salir adelante y tratar de ser mejor. Además lo dedico a mis padres, los cuales me dieron la vida, lo que soy es por ellos, por su dedicación a nosotros, al educarnos, guiarnos y siempre orientarnos a ser mejores, a siempre querer llegar más lejos. No tengo palabras para agradecerles. A mis hermanos, que siempre han estado a mi lado también en las ocasiones de triunfo y en las de dificultad, los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente al Dr. Lucio Vera Cabrera mi Asesor de tesis, sin el cual, este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo. Muchas gracias Doctor, por siempre exigirnos más, tratando de llegar a la excelencia. Al Dr. med. Oliverio Welsh Lozano, Dra. Nohemí Waksman y al Dr. Jorge Ocampo Candiani por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias y empeño para la realización del presente trabajo.

Al Dr. Héctor Gerardo Lozano por su gran ayuda en el área de bioterio y manejo de ratones. Sin su gran ayuda y conocimiento el área de trabajo con los ratones no se hubiera podido llevar a cabo. Muchísimas gracias Doctor.

Al Dr. Jorge Castro, por su apoyo y dedicación en el manejo y preparación de los macrófagos utilizados en este trabajo.

A las Químicas Wendy Escalante y Eva González, por todo su tiempo en asesorarme y ayudarme a trabajar en el área de laboratorio.

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social por permitirme el uso de sus instalaciones y equipo, además de su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio.

A mi familia por el apoyo moral que siempre me ha brindado y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

INDICE

Portada.....	i
Carta de aprobación de Tesis.....	ii
Resumen.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Índice.....	vi
Abreviaturas	viii
Índice de Tablas y Figuras	
Figuras.....	xi
Tablas.....	xiv
Introducción	
Historia.....	1
Generalidades.....	1
Distribución geográfica.....	2
Etiopatogenia.....	3
Cuadro clínico.....	4
Diagnóstico.....	5
Tratamiento.....	5
Importancia.....	9
Originalidad.....	9
Justificación.....	9

Hipótesis.....	10
Objetivos	
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos.....	11
Materiales y métodos.....	12
Resultados.....	30
Discusión.....	49
Conclusiones finales.....	53
Referencias bibliográficas.....	54
Resumen Autobiográfico.....	60
Apéndice A.....	61

ABREVIATURAS:

µl	Microlitros
ANOVA	Análisis de varianza
BALB/c	Variedad de ratón Albino criada en el laboratorio.
BHI	Brain Heart Infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool. Es un programa básico de alineamiento de secuencias de DNA o proteínas.
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
CIP	Ciprofloxacino
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CO ₂	Dióxido de carbono
DDS	Diaminodifenilsulfona
DU	Dosis única
EU	Estados Unidos
GAT	Gatifloxacino
gr	Gramos
HCl	Acido clorhídrico
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
Hr	Hora
IM	Intramuscular

INH	Isoniazida
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	Fosfato Dipotásico
KCl	Cloruro de Potasio
Kg	Kilogramo
KH_2PO_4	Fosfato de Potasio Dihidrogenado
Lt	Litro
M	Molar
mg	Miligramo
$MgCl_2$	Cloruro de Magnesio
min	Minutos
ml	Mililitro
MOX	Moxifloxacino
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	Fosfato Disódico Dodecahidratado
Na_2HPO_4	Fosfato Disódico Hidrogenado
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
NTP's	Ribonucleoside-5'-tri-phosphatos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción de Cadena Polimerasa
pH	<i>pondus Hydrogenium</i> . Concentración de iones hidrógeno en una solución.
QRDR	Región determinante de Resistencia a las quinolonas
RPM	Revoluciones por minuto
SC	Subcutáneo

SMX	Sulfametoxasol
SPX	Esparfloxacino
SXT	Trimetoprim/Sulfametoxasol
TAE	Tris-Acetate-EDTA. Buffer utilizado para geles de electroforesis
UFC	Unidades formadoras de colonias
VO	Vía oral

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

• **FIGURAS:**

Fig. 1: Distribución de las concentraciones de antibiótico en las placas de CMI.....	13
Fig. 2: Distribución de las placas para el ensayo con macrófagos.....	19
Fig. 3: Determinación de fluorescencia de diferentes concentraciones en suspensión de bacterias.....	32
Fig. 4: Curva de crecimiento bacteriano en macrófagos, en contacto con CIP.....	33
Fig. 5: Curva de crecimiento bacteriano en macrófagos, en contacto con SXT.....	34
Fig. 6: Curva de crecimiento bacteriano en macrófagos, en contacto con MOX.....	35
Fig. 7: Curva de crecimiento bacteriano en macrófagos, en contacto con GAT.....	36
Fig. 8: Concentración plasmática de MOX ($\mu\text{g/ml}$) en ratones BALB/c a dosis de 12.5 mg/kg (negro) y 25 mg/kg (blanco), administración SC.....	37

Fig. 9: Concentración plasmática de CIP ($\mu\text{g/ml}$) en ratones BALB/c a dosis de 12.5 mg/kg (blanco) y 25 mg/kg (negro), administración SC.....	38
Fig. 10: Concentración plasmática de SPX ($\mu\text{g/ml}$) en ratones BALB/c a dosis de 100 mg/kg administrado VO.....	38
Fig. 11: Concentración plasmática de GAT ($\mu\text{g/ml}$) en ratones BALB/c a dosis de 100 mg/kg administrado VO.....	39
Fig. 12: Concentración plasmática de MOX ($\mu\text{g/ml}$) en ratones BALB/c a dosis de 100 mg/kg administrado VO.....	39
Fig. 13: Concentración plasmática de SXT ($\mu\text{g/ml}$) en ratones BALB/c a dosis de 50 mg/kg (basados en SMX) administrado VO.....	40
Fig. 14: Sistema de evaluación en cruces para el ensayo <i>in vivo</i> en ratones BALB/c.....	42
Fig. 15: Efecto de los antimicrobianos en el modelo experimental. Se evaluaron: CIP (25 mg/kg) administración SC, MOX(25 mg/kg) administración SC, SXT (50 mg/kg) administración en agua de beber y MOX (25 mg/kg) administración SC + SXT (50 mg/kg)....	42
Fig. 16: Efecto de los antimicrobianos en el modelo experimental. Se evaluaron: SPX (100 mg/kg) + SXT (50 mg/kg), MOX (100 mg/kg) + SXT (50 mg/kg), GAT (100 mg/kg) + SXT (50 mg/kg) y MOX (100 mg/kg), SPX (100 mg/kg).	44

Fig. 17: Gel de agarosa para G1-G2 y <i>GyrA1-GyrA2</i> para CIP, MOX y GAT.....	47
--	----

- **TABLAS:**

Tabla 1: Concentraciones de antimicrobiano (acorde al CMI de cada uno) utilizadas en los ensayos de macrófagos.....	17
Tabla 2: CMI realizadas en 30 cepas de <i>Nocardia brasiliensis</i> HUJEG-1.....	30
Tabla 3: CMI de los antimicrobianos utilizados en este estudio.....	31
Tabla 4: Crecimientos bacterianos para CIP, SPX, GAT, MOX, SXT, MOX+SXT, GAT+SXT a las diferentes concentraciones de CMI.....	45
Tabla 5: Cambios en las CMI post exposición a los antibióticos. (resistencia bacteriana).....	45

INTRODUCCIÓN

Historia:

El micetoma fue descrito por primera vez por John Gill en 1842, en la zona de Madura; en India, años más tarde fue llamada “Pié de Madura” por Colebrook (1,2). Hacia el año de 1860, Carter determinó que la etiología del mismo era fúngica, y propuso el término micetoma (que significa “tumor por hongos”). En 1913 Pinoy dividió a los agentes causales en dos grupos: actinomicetomas y eumicetomas. En nuestro país, el primer caso fue descrito por Cicero en 1902. (3)

Generalidades:

El micetoma, es un síndrome anatomoclínico, de tipo inflamatorio crónico, que afecta la piel, tejido celular subcutáneo, en ocasiones huesos e inclusive vísceras (4). La localización más frecuente es en el pié o en extremidades inferiores (5) y se caracteriza por tumefacción, deformación del área y fístulas que drenan un exudado seroso o purulento en el que se encuentra el agente causal formando “granos” (microcolonias) (6). Se origina por inoculación traumática exógena de hongos o actinomicetos, se denomina actinomicetoma o eumicetoma (7).

Existe en todo el mundo, principalmente en países intertropicales, entre el Ecuador y el trópico del Cáncer, en especial Asia, África y América. En

México se encontró una frecuencia de 70 casos por año, predominando en centro, norte y noreste de la República (13). En general, *Nocardia spp.* se ha aislado en todo el mundo, ya sea en el medio ambiente o en infecciones que se presentan en humanos (8).

El micetoma predomina en varones a razón de 3:1. Más del 60% de los pacientes afectados son campesinos que andan descalzos, los cuales están más expuestos a traumatismos (6). En ocasiones la localización depende de la ocupación, ya que los cargadores de leña comúnmente presentan las lesiones en la espalda (11). En pacientes inmunocompetentes se presenta la enfermedad por inoculación traumática del organismo, mientras que en los individuos inmunocomprometidos, el tracto respiratorio es con frecuencia el sitio inicial de infección (9). En pacientes que presentan alguna enfermedad granulomatosa crónica, se ha visto que presentan infecciones recurrentes por ciertos agentes, entre ellos, *Nocardia spp.* (10).

Distribución geográfica:

La distribución geográfica mundial es de 60% actinomicetomas y 40% eumicetomas (causado por hongos verdaderos). En México el 98% de los micetomas son actinomicéticos. De estos el 86.6% es causado por *Nocardia brasiliensis* (7). Otros agentes causales que son menos frecuentes en nuestro país son: *Actinomadura pelletieri* y *Streptomyces somaliensis*. Los eumicetos en México causan el 2% de los casos de micetoma. Los agentes de eumicetoma mas comúnmente aislados en nuestro país son: *Madurella*

mycetomatis, *Madurella grisea* y *Fusarium* spp. El micetoma presenta una incidencia de nuestro país de 70 casos por año, siendo el estado de Nuevo León uno de los sitios que presenta un mayor número de casos (12). En el Hospital Universitario “José E. González”, que es un lugar con un importante volumen de pacientes y al cual refieren muchos casos; existen datos donde entre 1990 al 2003 se presentaron 101 casos nuevos (promedio de 8 por año). De estos casos el 42% era proveniente del estado de Nuevo León, 37% de los estados de San Luis Potosí, Coahuila y Tamaulipas (13).

Etiopatogenia:

Nocardia brasiliensis es una bacteria que pertenece al orden Actinomycetales, familia *Nocardiaceae* y género *Nocardia*. El género *Nocardia* está filogenéticamente relacionado con otros géneros bacterianos como: *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Gordonia*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella*. *Nocardia brasiliensis* es un bacilo aerobio, intracelular facultativo, no móvil, Gram positivo y parcialmente ácido-alcohol resistente. Produce filamentos ramificados tanto en cultivos como en los tejidos, que al microscopio se observan como filamentos microsifonados (0.5-1 μ), que se fragmentan en formas cocoides y bacilares. Tiene una pared celular semejante a la de las micobacterias compuesta de: peptidoglicano, atabinogalactano y ácidos nocardiomicólicos. (14, 15, 16)

Los agentes causales viven como saprofitos en la naturaleza, en el suelo o los vegetales; se introducen a la piel de los seres humanos a través de algún traumatismo, casi siempre por una espina vegetal, pero es posible que lo hagan

con astillas de madera, piedras o instrumentos metálicos contaminados con tierra que contiene la bacteria. Después de la infección, los microorganismos emiten filamentos en los tejidos y como una forma de resistencia, se aglomeran en colonias más o menos compactas, denominadas “granos”, que se eliminan en una secreción mucoide a través de fístulas. El color de estos “granos” nos permite orientarnos hacia el diagnóstico del posible agente causal. Si los granos son de color rojo su agente causal probable es actinomiceto, si son de color negro, es de origen micótico, y si son de color blanco o amarillento se le debe de realizar un estudio histológico y microbiológico para tener una mayor certeza (17). El mecanismo exacto por el cual el hospedero con inmunidad íntegra responde ante el micetoma, no está bien establecido (18), pero se ha visto que en los tejidos alrededor del grano hay una reacción supurativa, formada principalmente por polimorfonucleares (PMN), fibrosis, neoformación vascular. En los eumicetos la reacción es de tipo granulomatosa. El daño en ambos, se extiende por contigüidad. En la última fase de invasión puede afectar tendones, nervios, vasos sanguíneos o linfáticos. Se han reportado casos de micetomas en pacientes con tratamiento inmunosupresor, debido a una menor respuesta del sistema inmune.

Cuadro clínico:

El periodo de incubación puede durar desde algunas semanas hasta años. El sitio más afectado son las extremidades inferiores (64%) o superiores (14%). El sitio tiene relación directa con el sitio de inoculación. El cuadro clínico se caracteriza por aumento de volumen, deformación de la región y abundantes

orificios fistulosos, sitio de salida de un exudado filante o seropurulento, donde se encuentran los llamados “granos”. La evolución es lenta sin regresión espontánea.

Los pacientes no presentan alteración del estado general, aunque las lesiones sean muy grandes. En el laboratorio solo presentan una mínima leucocitosis (10,000-15,000), neutrofilia, aumento de la velocidad de sedimentación globular y en algunos casos anemia microcítica hipocrómica (19).

Determinar la especie del organismo infectante puede ser de utilidad para definir el curso de la enfermedad y elegir el tratamiento más indicado, además de que existe diferente patogenicidad entre las diversas especies de este género (9).

Diagnóstico:

Para poder llegar al diagnóstico se necesita analizar la secreción de las fístulas de los pacientes o tomar una biopsia del sitio afectado para procesarlo (21).

Los métodos diagnósticos son diversos, desde las diferencias morfológicas en los cultivos, las pruebas bioquímicas de caseína, tirosina e hipoxantina (22), clasificación por análisis de DNA a través de PCR (20).

Tratamiento:

Existen diferentes tratamientos para el micetoma. El micetoma actinomicético es tratado de primera instancia con trimetoprim/sulfametoxazol

(SXT) 8/40 mg/Kg/día; con este esquema terapéutico se obtiene una tasa de curación del 70% (23, 24). Otras opciones terapéuticas incluyen el uso de: amoxicilina/ácido clavulánico, sulfonamidas, diaminodifenilsulfona (DDS), minociclina, estreptomicina, isoniacida (INH), entre otros. (25). En caso de no presentarse respuesta al tratamiento, se pueden administrar esquemas alternos como: SXT en combinación con DDS (1.5 mg/Kg/día) vía oral (VO), en dosis única (DU) o estreptomicina 15 mg/Kg IM DU por uno o dos meses (26). En casos de micetomas extensos, con afección ósea, con tendencia a diseminarse, con pobre respuesta al tratamiento administrado o en casos recalcitrantes (27), se usa SXT con amikacina (23). Se administra SXT 8/40 mg/Kg/día por 5 semanas y amikacina 15 mg/Kg/día por 3 semanas. Esto es considerado un ciclo (24) y se obtiene una cura de hasta el 95%. (27). Este ciclo se puede repetir en 3-5 ocasiones. Entre cada ciclo se requiere verificar al paciente con audiometría y depuración de creatinina. (24).

Se han estado realizando estudios para encontrar nuevos medicamentos que puedan servir para estos pacientes y se ha observado que las oxazolidinonas como el linezolid muestra buena respuesta, obteniendo una CMI más baja que la amikacina (28). Existe un reporte de un paciente con Nocardiosis por *Nocardia transvalensis* con linfopenia, resistente a sulfas, aminoglucósidos y quinolonas. Se le dio linezolid 600 mg/día por 3 meses, obteniendo curación (32). Existen reportes de Nocardiosis en los que se probaron las CMI de CIP, SPX, amikacina, SXT, minociclina, *imipenem* y se observó que algunas eran efectivas, pero se observaron efectos sinérgicos de amikacina con SXT, minociclina, imipenem y SPX (29). Se ha descubierto

también que existe una nueva droga DA-7867, la cual tiene efecto contra *Nocardia brasiliensis* y presenta una buena respuesta, con una CMI del 90% con 0.03 µg/ml y del 50% con 0.06 µg/ml, se han hecho estudios *in vitro* (26) e *in vivo* (30).

Existen estudios en *Mycobacterium tuberculosis* con algunos medicamentos de la familia de las quinolonas. *M. tuberculosis* y *Nocardia brasiliensis* se relacionan filogenéticamente, ambos son difíciles de tratar y tienen un comportamiento similar. Se sabe que MOX tiene una vida media en los adultos de 9-12 hrs. Existen estudios *in vitro* con dosis de 100 mg/Kg donde demuestra el mismo efecto bactericida que la INH en modelos murinos (29). Se observa que MOX disminuye las unidades formadoras de colonias (UFC) de *M. tuberculosis* en bazo a dosis de 200-400 mg/Kg, pero al mes, los modelos murinos muestran datos de toxicidad. (31). Se ha buscado conocer si el uso de MOX contra *M. tuberculosis* presenta efecto sinergista para las drogas actuales, pero solo se observó este efecto en modelos en ratones BALB/c con etionamida. (33). Se han comparado los efectos de MOX y GAT contra *M. tuberculosis* y muestran actividades similares. (34).

El SPX es una fluoroquinolona de tercera generación (35) que ha mostrado efectos en infecciones de vías respiratorias resistentes a beta-lactámicos (36). Presenta buen efecto *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* contra *M. tuberculosis*, presentando efectos sinergistas con las drogas de primera línea utilizadas actualmente y disminuyendo las UFC (37, 38). Se han hecho estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* contra *Mycobacterium spp.* con el SPX y se ha observado buen efecto intracelular y en modelos animales (39).

Actualmente se buscan terapias alternativas para los pacientes con micetoma, ya que las actuales pueden presentar efectos adversos no deseados y su posología no es cómoda. Para llegar a administrar a un paciente algún medicamento para una entidad patológica, debe de existir una fuerte evidencia previamente probada *in vitro*, *ex-vivo* e *in vivo*. Actualmente existen estudios ya realizados *in vitro* de algunas de las drogas a utilizar en este estudio (25). Los estudios *ex vivo* se han realizado en macrófagos, probando principalmente para *Nocardia asteroides* (40, 41, 42) y *M. tuberculosis* (43, 44, 45, 46). Se han realizado los estudios en macrófagos alveolares en conejo (41, 47), peritoneales de ratón (40, 42), de médula ósea de ratón (43). Existen en la literatura estudios realizados con *N. brasiliensis* en macrófagos, con buena respuesta a ciertos medicamentos (51).

Los modelos *in vivo* en ratones BALB/c ya se han realizado anteriormente probando diferentes antibióticos contra *N. brasiliensis* y así se evalúa el efecto del antibiótico (25).

En este trabajo probaremos la eficacia de algunas quinolonas contra *N. brasiliensis*. Ya que se ha observado que este grupo de antibióticos tiene efecto contra *Mycobacterium* y contra algunas especies de *Nocardia* no *brasiliensis*. Evaluaremos su efecto *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, tratando de encontrar alternativas terapéuticas para esta entidad.

IMPORTANCIA

Es importante descubrir nuevas alternativas de tratamiento para los pacientes con micetoma causado por *Nocardia brasiliensis*, además de encontrar medicamentos que posean menor toxicidad.

ORIGINALIDAD

No se conoce el efecto de moxifloxacino, esparfloxacino y/o ciprofloxacino solos o en combinación con SXT en modelos experimentales de actinomicetomas.

JUSTIFICACIÓN

Encontrar terapias alternativas para los pacientes con micetoma por *Nocardia brasiliensis*, encontrando su efecto *in vitro* y posteriormente corroborarlo *in vivo* en modelos experimentales en ratones BALB/c, antes de realizar estudios *in vivo* en humanos para corroborar la seguridad de la administración.

HIPÓTESIS

Nocardia brasiliensis es sensible *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* a moxifloxacino, esparfloxacino y ciprofloxacino.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la eficacia de moxifloxacino, esparfloxacino y ciprofloxacino contra *Nocardia brasiliensis in vitro, ex vivo* en monocapas de macrófagos THP-1 y en un modelo experimental en ratones BALB/c.

Objetivos específicos:

1.- Determinar la concentración mínima inhibitoria de ciprofloxacino y esparfloxacino para *Nocardia brasiliensis*.

2.- Observar el efecto en macrófagos infectados por *Nocardia brasiliensis* en presencia de moxifloxacino, esparfloxacino y ciprofloxacino.

3.- Determinar las concentraciones plasmáticas de moxifloxacino, esparfloxacino, ciprofloxacino y SXT en ratones BALB/c.

4.- Estudiar del efecto de las quinolonas en un modelo *in vivo* en ratones BALB/c infectados por *Nocardia brasiliensis*.

5.- Determinar las tasas de mutación de *Nocardia brasiliensis* a moxifloxacino, esparfloxacino y ciprofloxacino.

6.- Determinar en las cepas resistentes a estas drogas la presencia de cambios genéticos en el gen *gyrA*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de ciprofloxacino y esparfloxacino para *Nocardia brasiliensis*.

Se evaluó la CMI del CIP y SPX. Para poder realizar este objetivo primero se preparó caldo Müller-Hilton (Oxoid, CM0337, Basingstoke, Hampshire, England) ajustado con cationes (Apéndice A). Posteriormente se realizaron las diluciones de los medicamentos a trabajar para que en placas de microtitulación de 96 pozos queden diluciones para cada medicamento: de 64 $\mu\text{g/ml}$ a 0.125 $\mu\text{g/ml}$, además de un control positivo y uno negativo. El control positivo se realiza con una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y el negativo con caldo Müller-Hilton. Se prepara la solución madre en caldo Müller-Hilton ajustado con cationes que contiene CIP Y SPX a una concentración de 1600 $\mu\text{g/ml}$, de manera que se toman 3.2 ml de la solución madre del medicamento con 16.8 ml de caldo Müller-Hilton con cationes, quedando una dilución de 256 $\mu\text{g/ml}$. De esta solución se toman 8 ml y se vierten 4 ml en cada uno de dos tubos cónicos de plástico de 50 ml, a estos 4 ml de solución madre se les agregan 4 ml de caldo Müller-Hilton con cationes quedando una dilución de 128 $\mu\text{g/ml}$; de este tubo se toman 4 ml y se le agregan 4 ml de caldo, quedando una dilución de 64 $\mu\text{g/ml}$; de este tubo se toman 4 ml y se le agregan 4 ml de caldo, quedando una dilución de 32 $\mu\text{g/ml}$; de este tubo se toman 4 ml y

se le agregan 4 ml de caldo, quedando una dilución de 16 $\mu\text{g/ml}$, así sucesivamente hasta llegar a una dilución de 0.125 $\mu\text{g/ml}$. Se procede a preparar las placas de microtitulación. La placa queda distribuida de la siguiente manera:

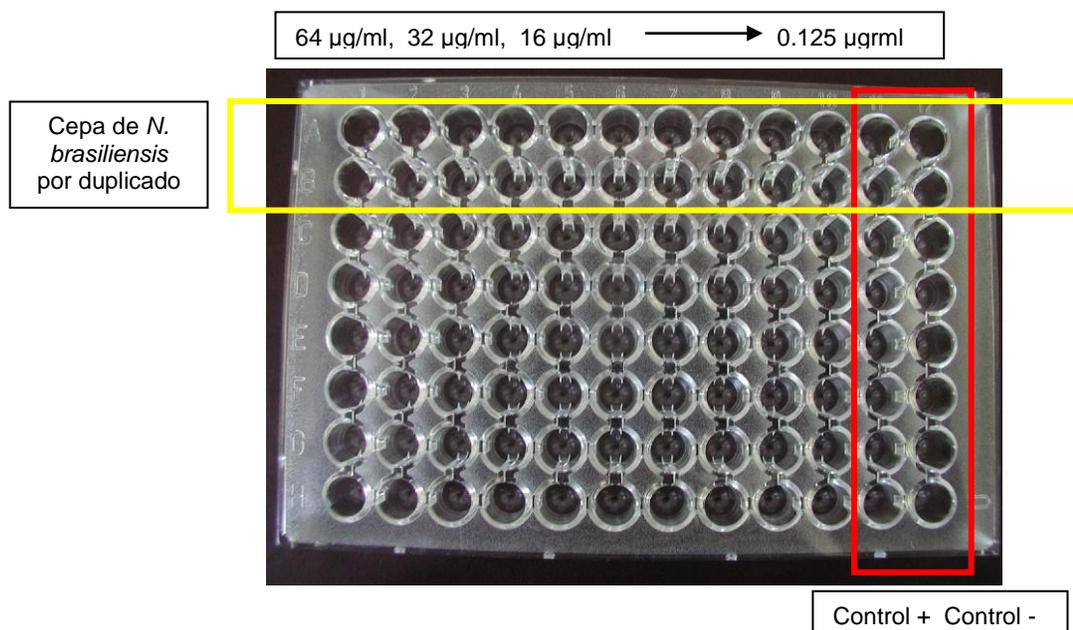


Fig. 1: Distribución de las concentraciones de antibiótico en las placas de CMI

El control se realiza con una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. En cada pozo se colocan 100 μl de caldo de la dilución establecida y 100 μl de una suspensión bacteriana con densidad igualada con tubos de McFarland de 0.5. En el control negativo se colocan 200 μl de caldo y en el control positivo 100 μl de caldo y 100 μl de la bacteria de *S. aureus*. Las CMI se realizan por duplicado, por lo que se realizan dos líneas de cada una de las cepas.

Para la cuantificación de células de *Nocardia brasiliensis* con un tubo McFarland 0.5 o 1 la técnica es la siguiente: Se preparan placas con agar sangre BHI (BD Bioxon, 214700, Edo. De México, Mex.) (Apéndice A). Ya frío el medio en las placas y solidificado, sembramos una cepa de *Nocardia brasiliensis* y se incuba a 37°C, las cepas para trabajar deben de ser menores de 14 días de incubadas, para mantenerlas jóvenes. Se colocan 3 a 5 gotas de agua bidestilada en tubos de vidrio de 16 X 150 mm estériles y se le colocan una pequeña cantidad de la colonia de *Nocardia brasiliensis*. Se macera la colonia dentro del tubo por 20-30 segundos hasta lograr una pasta. Se le agrega solución salina hasta igualar la turbidez con el tubo Mc Farland 0.5 o 1. Se coloca en el vortex (Daigger Vortex Genie 2 G-560, Scientific Industries, Bohemia, NY, EU) por unos segundos para mezclar bien. De esta mezcla es de la que se toman los 100 µl para colocar en las placas a las que ya se les añadió el medicamento a las concentraciones establecidas. Se incubaron a 37°C y a las 24 hrs se interpretándose de manera provisional el resultado, dando la lectura definitiva a las 48 hrs. Esto se realizó con 30 cepas de *Nocardia brasiliensis* aisladas de pacientes de la consulta de Dermatología del Hospital Universitario.

2.- Determinación del efecto del moxifloxacino, esparfloxacino y ciprofloxacino sobre *Nocardia brasiliensis* intracelular en un cultivo de macrófagos humanos THP-1.

Nocardia brasiliensis se sembró en agar sabouraud utilizando un asa (Difco Laboratories, Detroit, MN, EU) (Apéndice A). A partir de este cultivo se

preparó una suspensión de las bacterias para inocular 1 ml de caldo BHI (Difco Laboratories) (Apéndice A) en un matraz de 200 ml. El cultivo se incubó a 37°C por 72 h en agitación continua a 110 RPM, utilizando un agitador orbital (New Brunswick Scientific C24, Edison, NJ, EU). Al final del tiempo de incubación, las bacterias fueron colectadas por centrifugación en tubos cónicos de plástico de 50 ml, Se centrifugaron por 5 min. (Eppendorf 5810R, Hamburgo, Alemania). Se decantó el medio y el sedimento se lavó 4 veces con 30 ml de solución salina estéril.

Posteriormente, la masa bacteriana suspendida en 5 ml de solución salina estéril se colocó en un homogeneizador Elvehjem-Potter (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, EU) y se homogeneizó dando golpes del émbolo para obtener una suspensión unicelular, no golpeando mas de 1 min. La suspensión se centrifugó a 100 xg por 5 min. El sedimento se resuspendió y se determinó las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en medio BHI con 5% de sangre de oveja e incubando los cultivos por 5-7 días a 37°C. La concentración de la suspensión fue de 6.3×10^8 UFC/ml. La suspensión preparada se almacenó en glicerina al 20 % a -70°C hasta su uso.

Los cultivos celulares utilizados en este trabajo son monocitos humanos de la línea celular THP-1. Las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, EU) (Apéndice A) con suero bovino fetal al 10% (FBS; Gibco-BRL) a 37°C y 5% de CO₂ en una incubadora (Nuaire NU-4750, Plymouth, MN, EU). Para su transformación en macrófagos, las células se subcultivaron 4 veces sin piruvato de sodio (Sigma, St. Louis, MO, EU). La densidad celular se determinó en una cámara de Neubauer y el inóculo se

ajustó a 4×10^5 cel/ml en medio RPMI adicionado con 10% de FBS y $10\mu\text{M}$ de 12-miristato-13-acetato de Forbol (PMA). Para los experimentos, las células fueron sembradas en microplacas de 24 pozos (Costar Corning, Daly City, California, EU), colocando 1 ml de la suspensión celular por pozo. Los cultivos fueron lavados cada 48 h con medio completo hasta completar su transformación y se utilizaron al cuarto día. Adicionalmente se sembraron células en cámaras sobre portaobjetos (Lab-Tek II, Chamber Slide System, Nunc, Fisher Scientific, Pittsburg, PA, EU) para llevar un registro gráfico del experimento.

La infección de los cultivos se realizó a una multiplicidad de infección de 1:6 (célula:bacteria). A los pozos con las células transformadas se les retiró con cuidado el medio de cultivo y se les agregó 1 ml de medio conteniendo 1×10^7 bacterias/ml. Para asegurarnos de mantener la homogeneidad en la suspensión durante todo el proceso de infección, la suspensión se agitó constantemente en vortex. Luego de la infección los cultivos se incubaron por 1 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO_2 . Enseguida los cultivos se lavaron 2 veces con PBS estéril precalentado a 37°C para retirar las bacterias extracelulares.

Posterior a los lavados, se agregaron los medicamentos a probar: SPX (Sigma-Aldrich, 56968, St. Louis MO, EU); CIP (Sigma-Aldrich, 17850, St. Louis MO, EU); SXT (Sulfametoxazol: Sigma-Aldrich, S-7507, St. Louis MO, EU) Trimetoprim (Sigma-Aldrich, T-7883, St. Louis MO; EU) y MOX (Avelox ® IV, 400 mg/250 ml, Lote B-145). Los medicamentos se utilizaron a las concentraciones: 0.25 X, 1 X, 4 X y 16 X del CMI, mostradas en la Tabla 1.

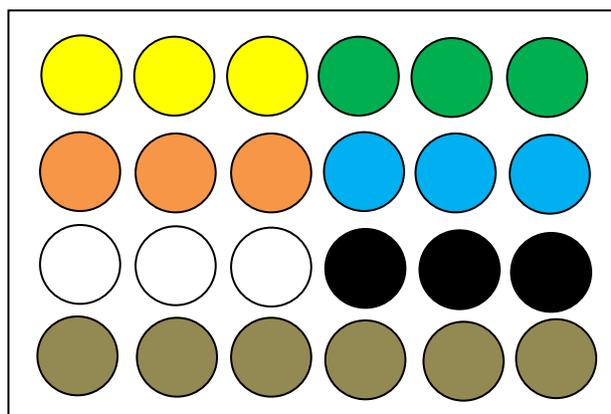
Quinolonas	Concentración en agar				
	CMI	0.25X del CMI	1X del CMI	4X del CMI	16X del CMI
CIP	4 µg/ml	1 µg/ml	4 µg/ml	16 µg/ml	64 µg/ml
GAT	0.25 µg/ml	0.625 µg/ml	0.25 µg/ml	1 µg/ml	4 µg/ml
SXT	2.3/0.12 µg/ml	0.575/0.03 µg/ml	2.3/0.12 µg/ml	9.2/0.48 µg/ml	36.8/1.92 µg/ml
GAT	0.25 µg/ml	0.625 µg/ml	0.25 µg/ml	1 µg/ml	4 µg/ml
INH	64 µg/ml	16 µg/ml	64 µg/ml	256 µg/ml	1024 µg/ml

Tabla 1: Concentraciones de los compuestos usados en el ensayo de macrófagos de acuerdo al CMI.

Se preparó una solución madre con PBS (Apéndice A) de cada uno de los medicamentos:

- MOX fue de 400 mg en 250 ml (quedando una concentración de 1.6 mg/ml)
- CIP 200 mg en 100 ml (quedando una concentración de 2 mg/ml)
- GAT 400 mg en 250 ml (quedando una concentración de 1.6 mg/ml)
- SXT se peso 0.114 mg SMX y 0.06 mg TMP (quedando una concentración de 2.64/8.85 µg/ml)
- IHN (Sigma-Aldrich, 13377, St. Louis MO, EU) se pesaron 12.28 mg y se colocaron en 3 ml de RPMI 1640 (quedando una concentración de 4.096 µg/ml).

La distribución de las placas se ilustra en la figura 2.



- Concentración 0.25 X del medicamento
- Concentración 1 X del CMI del medicamento
- Concentración 4 X del CMI del medicamento
- Concentración 16 X del CMI del medicamento
- Control negativo
- Control positivo
- INH 0.25 X los primeros tres pozos y de 1 X en los segundos tres pozos. En la segunda placa se realizan las concentraciones de 4 X y de 16 X del CMI.

Fig. 2: Distribución de las placas para el ensayo con macrófagos

En cada pozo se agregó 1 ml de la solución de cada antibiótico y los cultivos se incubaron por 6 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. La distribución de los antibióticos en la microplaca se muestra en la figura 2. Al final del tiempo de incubación el medio de cultivo se retiró de los pozos y se agregó 1 ml de agua bidestilada estéril a 4°C con la finalidad de lisar las células y liberar las bacterias intracelulares; los cultivos se rasparon con la misma punta para terminar de desprender los restos celulares y todo el contenido se colectó en tubos Eppendorf de 1.5 ml (Fisher Scientific), estos se centrifugaron por 5

min (Eppendorf 5417C, Hamburg, Alemania). El sobrenadante se retiró y el sedimento se lavó con 500 µl de agua bidestilada estéril a 4°C. Al final del lavado se agregaron 500 µl de azul alamar a una dilución 1:9 (Trek Diagnostics Systems, Cleveland, OH, EU) en medio LH (Apéndice A) y se incubaron en rotación continua a 37°C por 24 hrs en horno de micro-hibridación (Autoblot microhibridization Oven, OMRON ESCS, BellCo Glass Inc Vineyard NJ). Los tubos se centrifugaron de nuevo y 200 µl de cada pozo se transfirieron a pozos en una microplaca de 96 pozos para determinar la fluorescencia en un lector de placas (Multi-Detection Microplate Reader, Synergy HT, Biotek Instruments, Winooski, VT, EU).

3.- Determinación de las concentraciones plasmáticas de moxifloxacino, esparfloxacino, ciprofloxacino y SXT en ratones BALB/c.

Se determinaron las concentraciones plasmáticas de los antimicrobianos mencionados en ratones BALB/c, se trabajó con 216 ratones. Las dosis con las que se trabajaron fueron las siguientes:

- MOX 12.5 y 25 mg/kg (administración SC)
- CIP 12.5 y 25 mg/kg (administración SC)
- MOX 100 mg/kg (administración VO)
- GAT 100 mg/kg (administración VO)
- SPX 100 mg/kg (administración VO)

- SXT 50 mg/kg es base a la dosis de SMX (administración VO)

En el caso de MOX y GAT se utilizaron los preparados comerciales: el Avelox® (Bayer, IV 400 mg/250 ml, Lote B-145), y el Ciproflox® (Senosiain, IV 200 mg/100 ml). Para el SPX (Sigma-Aldrich, 56968, St. Louis MO, EU) y el SXT (Sulfametoxazol: Sigma-Aldrich, S-7507, St. Louis MO, EU. Trimetoprim, Sigma-Aldrich, T-7883, St. Louis MO; EU) se utilizó la sal pura y se disolvió en agua bidestilada para su administración VO. La dosis correspondiente para cada grupo de ratones se disolvió en agua bidestilada para poder ser administrados por VO. En el caso de GAT se utilizó Tequin® (Bristol-Myers tabletas 500 mg) se pulverizaron las tabletas con mortero y se disolvieron en agua bidestilada para su administración por VO. Los medicamentos administrados de manera SC y de disposición comercial (MOX y CIP), se liofilizaron (Labconco 77545-10, Freezone 12, Kansas MO, EU) para poder disecar la sal pura y disolverla en una menor cantidad de agua bidestilada para poder aplicar la misma cantidad de medicamento, en una menor cantidad de líquido, la cual fuera tolerable y adecuada al tamaño de los ratones. Posterior a la liofilización para obtener 25 mg/kg se administraron 0.2 ml SC de CIP y 0.3 ml SC de MOX ambas en el dorso de los ratones. Esta dosis se calculó de acuerdo al peso promedio de los ratones. Para la administración por vía oral de los medicamentos, se disolvieron los compuestos sólidos en 0.2 ml de agua bidestilada. Se distribuyeron los grupos de los ratones de manera que fueran 3 ratones BALB/c para cada tiempo de toma de muestra. Los tiempos de evaluación fueron: 0 min, 20 min, 40 min, 60 min, 120 min, 240 min, 360 min, 480 min y 600 min. Además se tuvo un grupo control para cada dosis de los

medicamentos, al cual no se le administró ningún compuesto. Se administraron los medicamentos a todos los grupos en el tiempo cero, excepto al grupo control. Se realizó de una manera rápida, para una curva mas fidedigna. En cada tiempo se tomaron 500 µl de sangre del seno infraorbitario de los ratones con capilares de vidrio y se colocó en tubos Eppendorf. Después de la extracción los ratones fueron sacrificados con éter. Posterior a la toma se colocaron las muestras en la microcentrífuga las a 5000 RPM por 5 min. Se tomaron 200 µl de suero que quedaron en la parte superior y se colocaron en tubos Eppendorf debidamente identificados y fueron congelados a -70°C para su conservación hasta su análisis. Se midieron las concentraciones plasmáticas por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). Las condiciones fueron las siguientes: se utilizó un cromatógrafo Waters 2690 Alliance con un detector de arreglo de diodos 996 y detector de fluorescencia modelo 474. La columna cromatográfica fue una Atlantis dC18 de 150 mm X 4.6 mm de diámetro interno y con tamaño de partícula de 5 µm. Las muestras fueron eluidas con una fase móvil que consistió en ácido trifluoroacético 0.1% y acetonitrilo en un programa de gradiente. La velocidad de flujo fue de 1 ml/min, el volumen de inyección de 10 µl. La cuantificación se llevó acabo por UV a 278 nm para TMP, SMX y SPX; y para las quinolonas (CIP, MOX y GAT) por fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 292 nm y a una longitud de onda de emisión de 525 nm. El tiempo total de análisis fue de 30 minutos.

4.- Estudio del efecto de las quinolonas en un modelo *in vivo* en ratones BALB/c infectados por *Nocardia brasiliensis*.

Se preparó el inóculo de *Nocardia brasiliensis* de la siguiente manera: Se tomó la muestra de ratones BALB/c previamente inoculados, se realizó asepsia con isodine y una torunda y se puncionó con una aguja una pústula del sitio de infección y se tomó la muestra con un hisopo estéril y se colocó en un tubo cónico de plástico de 20 ml con 3-5 gotas de agua estéril. Se tiene que sembrar en agar sangre la muestra el mismo día que se toma. Se busca que la muestra se desarrolle sin ninguna contaminación. Se tomó la muestra de *Nocardia brasiliensis*, que haya crecido en las placas. Se tomó la mayor cantidad posible y se maceró con un potter por unos segundos (no más de 1 min para no desintegrar las células). Se agregó agua estéril o solución salina (aproximadamente 2 ml), se dejó reposar unos minutos. De la parte superior del sobrenadante (lo menos turbio) se tomaron 0.5 ml y se colocaron en 3 matraces de vidrio de 500 ml que contienen 50 ml de medio BHI en caldo (Difco, 275730, Detroit MN, EU). El inóculo que se coloca debe de ser tan pequeño para que no se vea en el caldo al colocarlo. Se dejaron los matraces en el agitador continuo a 37°C con 110 RPM y se dejaron 72 hrs. Se retiraron los matraces y se dejaron reposar por 10 minutos, se vació cada matraz en un tubo cónico de plástico de 50 ml estéril. Se centrifugaron a 2500 RPM por 10 min. Al terminar se dejaron reposar para decantar el caldo que queda de sobrenadante. Se tomó la masa de los 3 matraces y se colocaron en un potter y se maceró por unos minutos. Se agregaron 10 ml de solución salina y se dejó reposar unos minutos. Del

sobrenadante se tomaron 10 ml y se colocaron en 2 matraces de de 2 lts (5 ml cada uno) y cada matraz tiene 500 ml de caldo BHI. Se colocaron de nuevo en el agitador continuo a 37°C con 110 RPM y se dejaron 72 hrs de nuevo. Se retiraron los matraces y se dejaron reposar. Se decantó el sobrenadante y la masa se colocó en un potter para macerar de nuevo por unos minutos. Se le agregaron unas gotas de solución salina y se colocaron en tubos cónicos de plástico de 50 ml. Se centrifugó a 2500 RPM por 10 min. Se retiró el sobrenadante y se agregó solución salina para realizar el lavado de las células. Se realizaron 3 lavados, colocando en cada ocasión entre 20 y 30 ml de solución salina y centrifugando a 2500 RPM por 10 min. En cada lavado se decantó el sobrenadante hasta que el líquido extraído fuera transparente, sin caldo BHI. Al final centrifugamos a 4000 RPM por 20 min para concentrar la masa. Se pesaron 2 gr de masa y se le colocaron 50 ml de solución salina para hacer el inóculo, el cual se ajusto a una concentración de 20 mg/50µl. Se deben de inocular los ratones el mismo día que se realiza este último paso. La inoculación se realizó de 20 mg de peso húmedo de *Nocardia brasiliensis*, de forma subcutánea, en el cojinete plantar derecho de cada ratón; haciendo revisiones semanales (2-3 semanas) esperando el desarrollo de la infección. Posterior a esto se iniciaron los ciclos con los medicamentos.

Se distribuyeron grupos de 15 ratones hembra BALB/c de entre 8 y 12 semanas. Se realizaron 2 ensayos de 3 meses cada uno. La administración del medicamento era por 3 semanas con una semana de descanso.

PRIMER ENSAYO:

El primero de los ensayos fue realizado con los siguientes medicamentos y a las siguientes dosis:

- MOX 25 mg/kg, administración SC cada 8 hrs.
- CIP 25 mg/kg, administración SC cada 8hrs.
- MOX 25 mg/kg, administración SC cada 8 hrs mas SXT 50 mg/kg (en base al SMX) en el agua a tomar cada 12 hrs.
- SXT 50 mg/kg en el agua a tomar cada 12 hrs.
- Control con solución salina, administración SC cada 8 hrs.

Para determinar la cantidad exacta de medicamento a administrar en el agua de beber: se ajusto de acuerdo al consumo de la droga más el agua de beber. Para ello se coloco en la jaula de los animales 45 ml de agua con la dosis del medicamento al inicio del día. A las 12 hrs se retiró el agua y se midió el consumo que era aproximadamente 3 ml de agua/ratón/12 hrs.

SEGUNDO ENSAYO:

Para el segundo ensayo quise valorar el efecto de los medicamentos en esta ocasión en administración oral, además de probar si existía un efecto sinergista con SXT.

La distribución de los grupos y de las dosis fueron las siguientes:

- MOX 100 mg/kg cada 12 hrs + SXT 50 mg/kg cada 12 hrs.
- SPX 100 mg/kg cada 12 hrs + SXT 50 mg/kg cada 12 hrs.
- GAT 100 mg/kg cada 12 hrs + SXT 50 mg/kg cada 12 hrs.
- SXT 50 mg/kg cada 12 hrs.
- Control agua cada 12 hrs.

5.- Determinación de las tasas de mutación de *Nocardia brasiliensis* a moxifloxacino, esparfloxacino y ciprofloxacino.

Se realizó la tasa de mutación con el fin de determinar la resistencia que puedan desarrollar algunas cepas de *Nocardia spp.* ante los antimicrobianos mencionados. La tasa de mutación *in vitro* se correlaciona con la actividad clínica de los antimicrobianos debido a que se determina la resistencia que pudieran desarrollar algunas cepas de *Nocardia spp.* ante ellos, por lo cual su actividad pudiera verse disminuida.

Se utilizaron 10 muestras de *Nocardia brasiliensis* de la cepa HUJEG-1. Se determinó el CMI para cada uno de los medicamentos de manera basal. Se sembraron en agar Muller-Hilton a una concentración de 1×10^{10} UFC y se le agregó al medio las concentraciones de los medicamentos 2X, 4X y 16X del CMI para cada uno (descritos en la página 32). Se mezclaron bien y se vaciaron en placas de petri y se dejaron solidificar. Se trabajó por triplicado para cada uno de los medicamentos y se incubaron a 37° C por 5 días. Posterior a esto

las cepas que crecieron se tomaron y se les volvió a determinar el CMI para cada uno de los medicamentos con la técnica ya descrita.

De los ratones BALB/c que presentaron una infección de 3 o más cruces, se tomó una muestra de pus, con la misma técnica ya descrita para la realización del inóculo (técnica descrita en la página 32), se sembró en agar sabouraud (BD Bioxon, 210700, Edo. De México, Mex) (Apéndice A).

6.- Determinación en las cepas resistentes a las quinolonas la presencia de cambios genéticos en el gen *gyrA*.

De las cepas en las que se observó cambio en las CMI, mostrando una resistencia a las quinolonas, se realizó purificación de DNA con el kit DNA Wizard® (Wizard® PCR Preps DNA Purification Systems, Promega). Primero se realizó la extracción de DNA de cada una de las muestras mencionadas, que se hizo de la siguiente manera: Se tomaron asadas de las cepas que crecieron en las placas de agar. Se tomó una pequeña cantidad y se colocaron en tubos Eppendorf. Se agregó 1 ml de éter y se agitó en el vortex por 1 min, esto para desengrasar la muestra. Se centrifugó a 2500 RPM por 30 seg para separar las células del éter. Al terminar se dejó reposar unos minutos, posteriormente se decantó el éter y se dejó secar a temperatura ambiente. Posterior a esto se procesó la muestra con el Prepman Ultra Sample® (Preparation Reagent, Applied Biosystems). A la muestra obtenida se le colocaron 200 µl del reactivo incluido en el kit. Se agitó en el vortex por 20-30 segundos. Se colocaron posteriormente las muestras en baño de agua a 100°C por 10 min.

Posteriormente se centrifugaron las muestras a 16,000g por 3 min. El sobrenadante se pasó a otro tubo eppendorf y se continuó el proceso para la realización del PCR. Para este proceso se colocaron en tubos Eppendorf la siguiente mezcla:

- 5 µl de buffer 10X de PCR .
- 5 µl de MgCl₂ 25 Mm.
- 5 µl de NTP's (10 Mm cada uno).
- 25 µl de agua.
- 0.1 µl de Taq polimerasa (Accu Taq® LA DNA Polymerase, D 8045-12SUN, Carlsbad, CA, EU) la cual debe de ser agregada al final para exponerla el menor tiempo posible al ambiente, para evitar su desintegración.
- 5 µl de primers (50 ng/µl), en este caso se utilizaron los siguientes:
 - *GyrA*:
 - *GyrA*-1: 5'-CAGCTACATCGACTATGCGA-3' } 320-pb
 - *GyrA*-2: 5'-GGGCTTCGGTGTACCTCAT-3' }
 - *G1* y *G2*:
 - *G1*: 5'-CAGCTACATCGACTATGAGA-3' } 320-pb
 - *G2*: 5'-GGGCTTCGGTGTACCTCAT-3' }

Estos primers fueron fabricados basándonos en un artículo de Peterson et al. (55) en el cual lograron amplificar el QRDR de moxifloxacin en estas regiones para *S. pneumoniae*.

Esto nos da un total de 45 μ l por cada una de las muestras, se multiplicó este número por la cantidad de muestras. Se colocaron en tubos previamente identificados con fecha, número de muestra y las bases utilizadas. Para completar 50 μ l se agregó el DNA problema (templado), como el DNA es de muestras, es total, por lo que se agregaron 3 μ l del DNA y 2 μ l de agua. Esto se colocó en el aparato de PCR (MJ Research PTL-200, Peltier Thermal Cycle).

Las condiciones para el PCR fueron las siguientes:

- Primers *G1* y *G2*:

- 95°C por 3 min
 - 94°C por 1 min
 - 50°C por 2 min
 - 72°C por 3 min
 - 72°C por 5 min
- } 35 veces

- Primers *Gyr*:

- 95°C por 3 min
 - 95°C por 1 min
 - 55°C por 1 min
 - 72°C por 1 min
 - 72°C por 5 min
- } 35 veces

Terminado este ciclo se procede a correr el PCR en gel de agarosa al 1% (Apéndice A). Ya fabricado el gel se vertió esta muestra en el contenedor en el que se corrió el gel, colocando el separador que incluye el número de pozos con el que trabajamos (un pozo por muestra). Nos esperamos de 20-30 min y se retira el separador. Se colocó en el aparato para polarizar la muestra y se

vertió TAE 1X hasta cubrir el carro y los cables conectados a él. Se mezcló 1 μ l de jugo azul y se colocaron 10 μ l del DNA extraído por PCR se mezclaron ambos en la pipeta con mucho cuidado. Esta muestra se colocó en cada pozo, al final se agregaron 5 μ l de los 100 pb. El gel se corrió a 80 volts y se dejó correr por 1 hora. Terminado el tiempo se sacó el gel y se secó. Se pasó a la cámara de lectura y se interpretó con el programa Labworks®. Se realizó la lectura del gel.

RESULTADOS

1.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria de ciprofloxacino y esparfloxacino para *Nocardia brasiliensis*.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Quinolonas	Concentración en agar		
	CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀
CIP	4-64 µg/ml	4 µg/ml	64 µg/ml
SPX	4-32 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml

Tabla 2: Resultados de las CMI realizadas en 30 cepas de *Nocardia brasiliensis*.

Solo se corrieron CIP Y SPX debido a que ya se cuenta con las CMI establecidas para el resto de los antibióticos a utilizar en este proyecto. Como podemos observar con estos resultados tanto CIP como SPX presentan CMI altas a comparación de otros medicamentos con los que trabajaremos, por lo que eso nos puede dar un indicio de que probablemente estos medicamentos no presenten una buena respuesta contra el micetoma causado por *Nocardia brasiliensis*. Sin embargo, con el fin de corroborar esto, se realizarán los ensayos en macrófagos y los ensayos in vivo en ratones BALB/c. A

continuación, para remarcar lo comentado, adjunto un resumen de las CMI de los medicamentos con los que trabajamos.

Quinolonas	Concentración en agar		
	CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀
CIP	4-64 µg/ml	4 µg/ml	64 µg/ml
SPX	4-32 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml
MOX	0.25-2 µg/ml	0.25 µg/ml	2 µg/ml
GAT	0.25-2 µg/ml	0.25 µg/ml	2 µg/ml
SXT	2.3/0.12- 9.5/0.5 µg/ml	4.75/0.25 µg/ml	9.5/0.5 µg/ml

Tabla 3: Resultados de las CMI de los antimicrobianos utilizados en este estudio

2.- Determinación del efecto del moxifloxacino, esparfloxacino y ciprofloxacino sobre *Nocardia brasiliensis* intracelular en un cultivo de macrófagos humanos THP-1.

El micetoma causado por *Nocardia brasiliensis* presenta un reto para su tratamiento. Esta bacteria es intracelular, por lo que es importante conocer si los medicamentos que vamos a usar contra esta enfermedad presentan actividad en este nivel. De eso deriva la importancia de este ensayo.

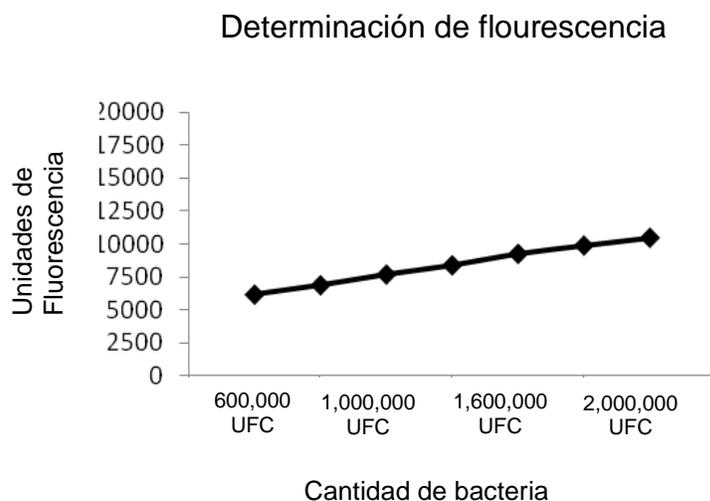


Fig. 3: Determinación de fluorescencia de diferentes concentraciones en suspensión de bacterias

Con esta curva corroboramos que el ensayo fue llevado a cabo de la manera correcta. Buscamos observar una mayor fluorescencia al haber una mayor cantidad de bacteria. Con esta curva tenemos la certeza de que la cantidad de bacteria es ascendente y la medición de la misma es adecuada. En el estudio lo que valoramos es el comportamiento del antimicrobiano frente a una cantidad determinada de bacterias intracelulares, y nosotros vamos aumentando la concentración del medicamento, con lo que, si el antimicrobiano tiene efecto intracelular, debe de ir descendiendo la fluorescencia.

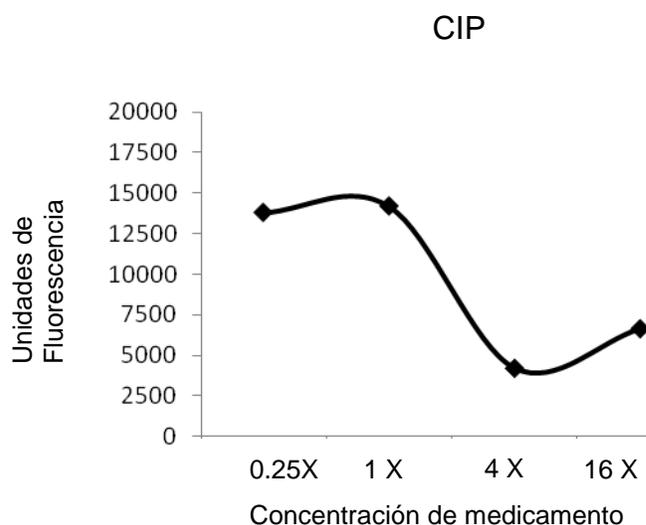


Fig. 4: Curva de crecimiento bacteriano en macrófagos, en contacto con CIP. La X es el número de veces que se multiplico el CMI, para aumentar la concentración del medicamento. Cada punto representa la medida de tres muestras.

En la figura 4 observamos que el resultado obtenido con CIP no es congruente (comparado con la gráfica de curva de crecimiento bacteriano) con una buena respuesta del medicamento a nivel intracelular, ya que a una concentración de 16X del CMI la fluorescencia aumenta, lo que nos indica una menor cantidad bacteriana. Por lo que se sugiere, como mencioné previamente, que a nivel intracelular no hay buena respuesta de CIP. Aunque sin embargo, hay otros fenómenos que pueden influir en estos resultados, ya que se ha observado que a elevadas concentraciones del medicamento hay baja disponibilidad del compuesto por aglomeración.

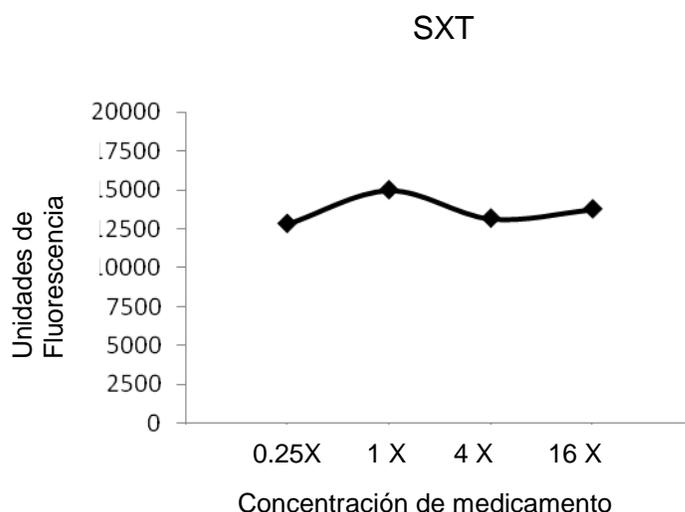


Fig. 5: Curva de crecimiento bacteriano en macrófagos, en contacto con SXT. La X es el número de veces que se multiplica el CMI, para aumentar la concentración del medicamento. Cada punto representa la medida de tres muestras.

En la figura 5, observamos que a pesar de que SXT es un medicamento clínicamente comprobado que tiene eficacia terapéutica contra micetoma por *Nocardia brasiliensis*, al momento de realizar el ensayo para probar el efecto intracelular, no se observa una respuesta adecuada. Esto pudiera estar relacionado con que el medicamento es bacteriostático, no bactericida y no muestra su actividad a nivel intracelular.

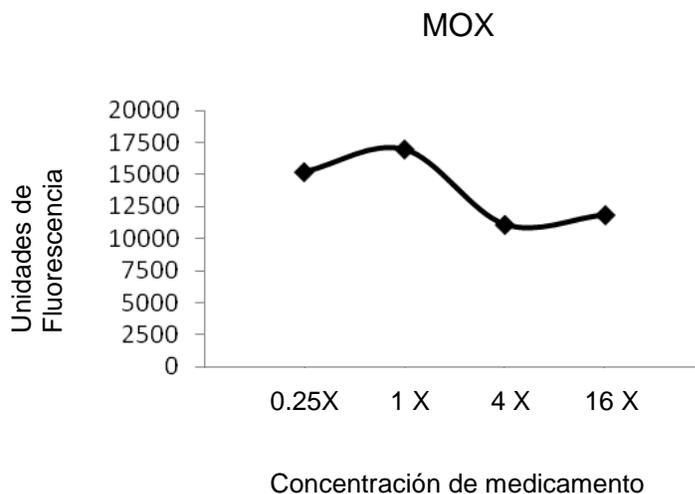


Fig. 6: Curva de crecimiento bacteriano en macrófagos, en contacto con MOX. La X es el número de veces que se multiplica el CMI, para aumentar la concentración del medicamento. Cada punto representa la medida de tres muestras.

En la figura 6, observamos una curva descendente, a mayor concentración de medicamento hay una menor cantidad bacteriana. Con esto nos damos cuenta que MOX presenta actividad intracelular contra esta bacteria y nos apoya en la teoría de que MOX es una buena alternativa como tratamiento para esta entidad.

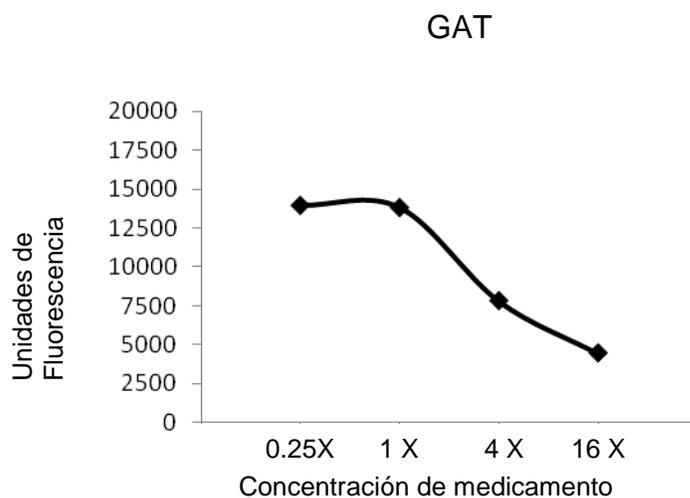


Fig. 7: Curva de crecimiento bacteriano en macrófagos, en contacto con GAT. La X es el número de veces que se multiplico el CMI, para aumentar la concentración del medicamento. Cada punto representa la medida de tres muestras.

Al igual que con MOX, GAT presenta una curva descendente adecuada, lo que nos lleva a concluir que este medicamento tiene una buena actividad intracelular contra esta bacteria.

3.- Determinación de las concentraciones plasmáticas de moxifloxacino, esparfloxacino, ciprofloxacino y SXT en ratones BALB/c.

Los resultados fueron los siguientes:

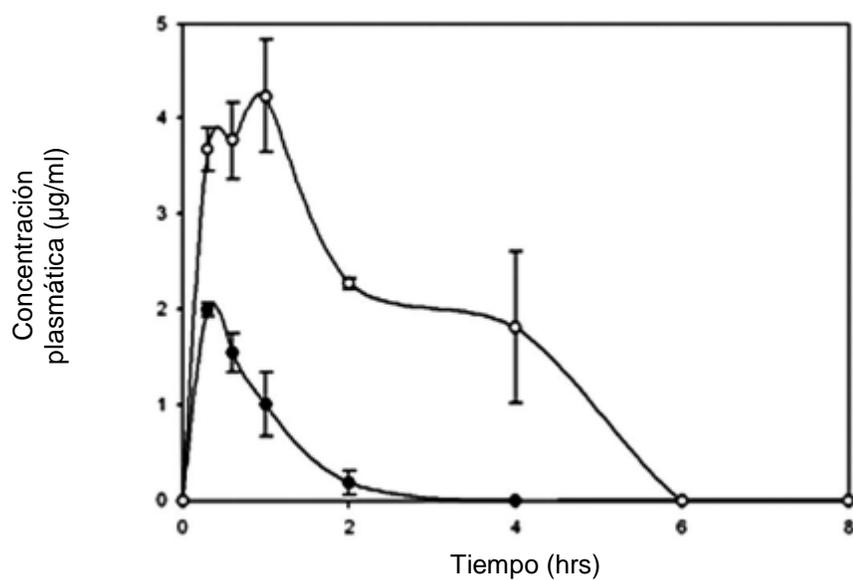


Fig. 8: Concentración plasmática ($\mu\text{g/ml}$) de MOX en ratones BALB/c a dosis de 12.5 mg/kg (círculo negro) y 25 mg/kg (círculo blanco), administración SC. Cada círculo representa la concentración plasmática media de tres animales. Las barras en cada círculo representan la derivación estándar.

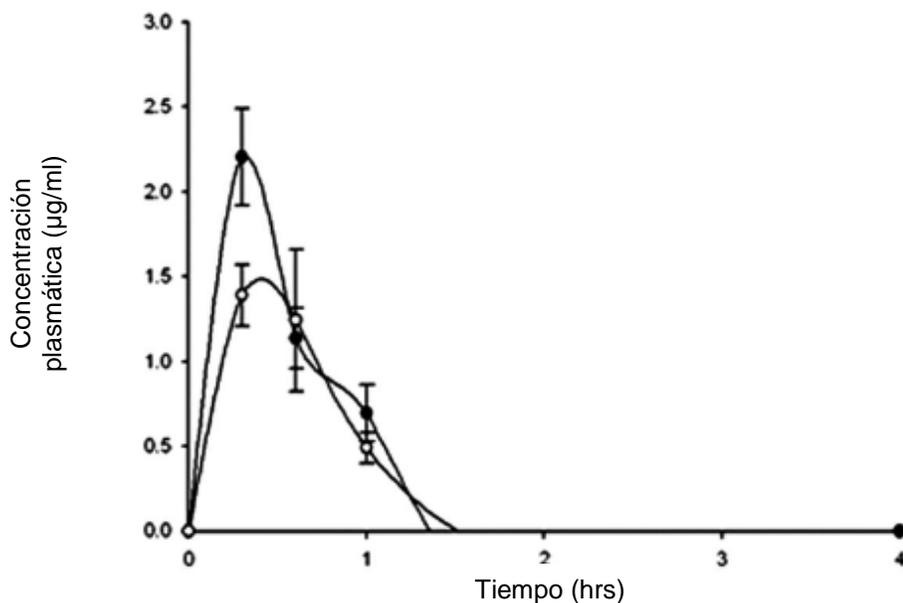


Fig. 9: Concentración plasmática de CIP ($\mu\text{g/ml}$) en ratones BALB/c a dosis de 12.5 mg/kg (circulo blanco) y 25 mg/kg (circulo negro), administración SC. Cada círculo representa la concentración plasmática media de tres animales. Las barras en cada círculo representan la derivación estándar.

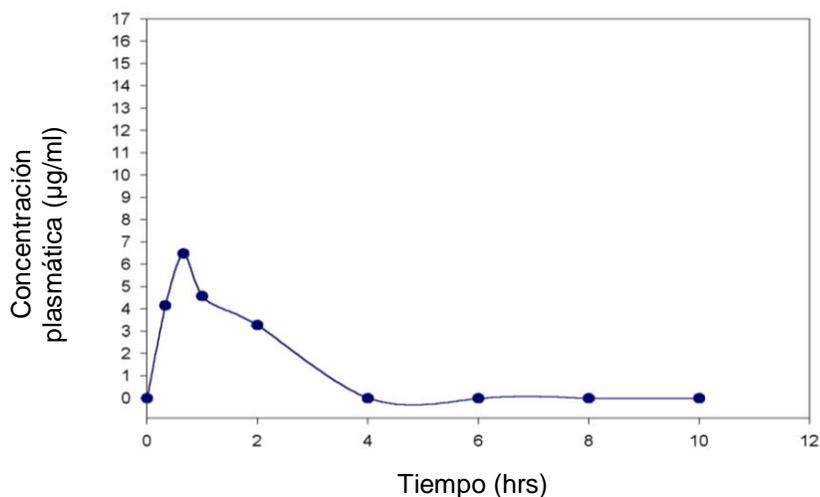


Fig. 10: Concentración plasmática de SPX ($\mu\text{g/ml}$) en ratones BALB/c a dosis de 100 mg/kg administrado en el agua de beber. Cada círculo representa la concentración plasmática la concentración plasmática media de tres animales.

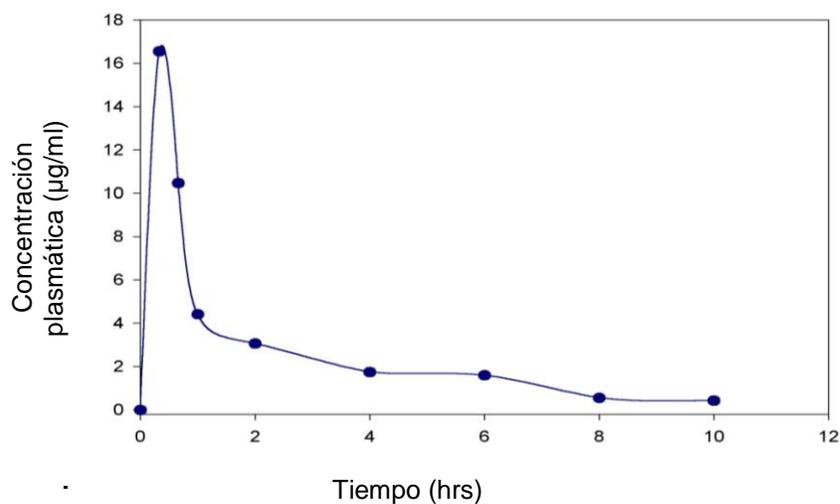


Fig. 11: Concentración plasmática de GAT ($\mu\text{g/ml}$) en ratones BALB/c a dosis de 100 mg/kg administrado en el agua de beber. Cada círculo representa la concentración plasmática la concentración plasmática media de tres animales.

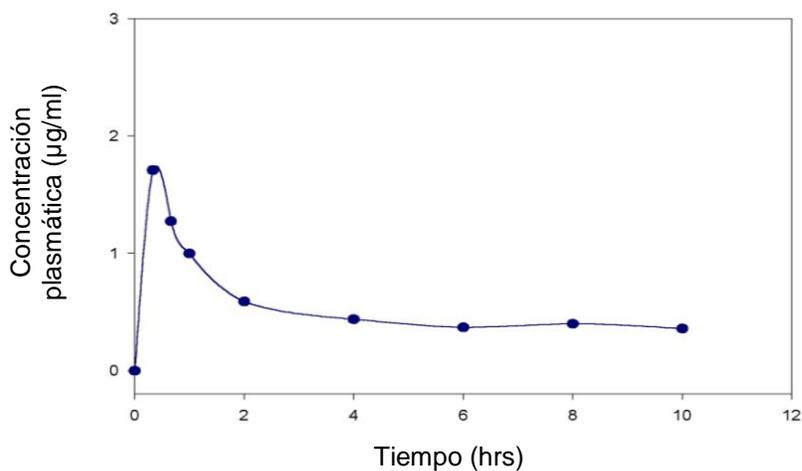


Fig. 12: Concentración plasmática de MOX ($\mu\text{g/ml}$) en ratones BALB/c a dosis de 100 mg/kg administrado en el agua de beber. Cada círculo representa la concentración plasmática la concentración plasmática media de tres animales.

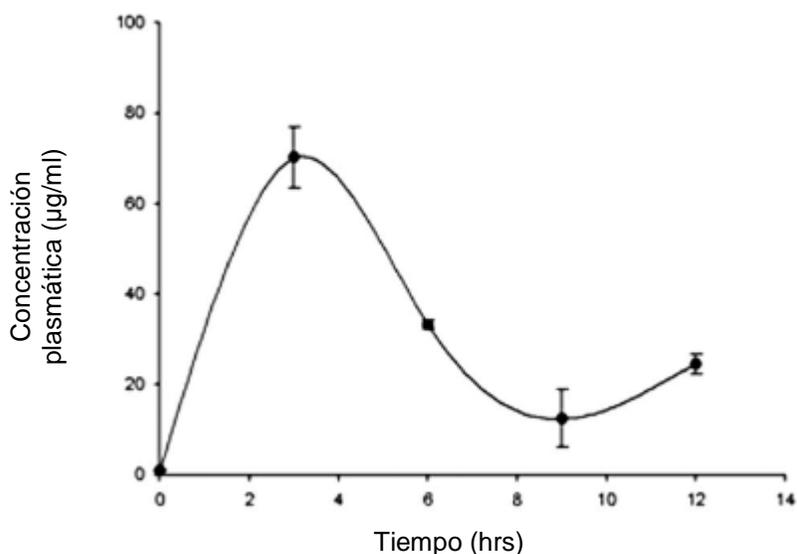


Fig. 13: Concentración plasmática de SXT ($\mu\text{g/ml}$) en ratones BALB/c a dosis de 50 mg/kg (basados en SMX) administrado en el agua de beber. Cada círculo representa la concentración plasmática la concentración plasmática media de tres animales. Las barras en cada círculo representan la derivación estándar.

Con estas gráficas, concluimos que GAT y MOX administrados VO presentan concentraciones mayores al CMI de HJEG-1 (CMI 0.25 $\mu\text{g/ml}$ para ambos medicamentos) para estos medicamentos y lo mantienen por más de 12 hrs, lo cual nos indica que pudieran ser potenciales alternativas terapéuticas para esta enfermedad. SXT ya es una parte del tratamiento para esta entidad y pudimos corroborar el motivo de su eficacia ya que mantiene una concentración muy superior al CMI de la cepa. CIP y SPX no alcanzan a superar el CMI, por lo que pudieran no tener una buena respuesta terapéutica. Se correlacionarán estos resultados con el ensayo *in vivo* en ratones BALB/c.

4.- Estudio del efecto de las quinolonas en un modelo *in vivo* en ratones BALB/c infectados por *Nocardia brasiliensis*.

La evaluación de los ciclos se realizaba al terminar la administración cada 3 semanas, por lo que se realizaron 3 revisiones por ensayo. La manera de evaluarlo es a base del sistema de cruces que es el siguiente:



+

Eritema y edema en la zona plantar



++

Eritema y edema más arriba de la zona plantar



+++

Eritema y edema arriba del talón de la pata



++++

Infección abarca la totalidad de la pata

Fig. 14: Sistema de evaluación en cruces para el ensayo *in vivo* en ratones BALB/c.

PRIMER ENSAYO

Realizado con CIP, MOX, SXT y MOX+SXT (Fig. 15)

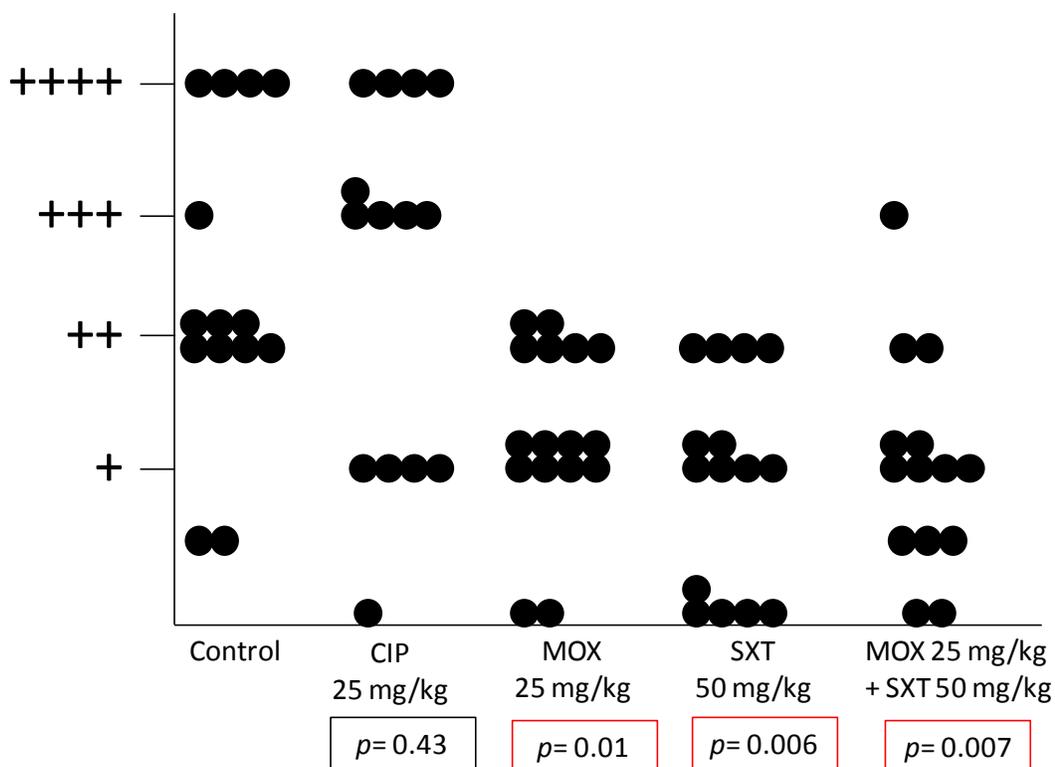


Fig. 15: Resultados del primer ensayo, se evaluaron los efectos de: CIP (25 mg/kg) administración SC, MOX (25 mg/kg) administración SC, SXT (50 mg/kg) administración en agua de beber y MOX (25 mg/kg) administración SC + SXT (50 mg/kg) administración en agua de beber. Cada punto representa un ratón hembra BALB/c.

La evaluación estadística se realizó con ANOVA. Los recuadros que se encuentran en la parte inferior de cada grupo son la evaluación estadística. Los recuadros en rojo representan un resultado estadísticamente significativo.

Como podemos observar en este reporte, nos damos cuenta que en el primer ensayo, con la administración SC, solo MOX y SXT solos o combinados mostraron una respuesta estadísticamente significativa. CIP no mostró tener efecto, pero esto se podía observar desde que se realizaron las concentraciones plasmáticas de los medicamentos y vimos que CIP no alcanza niveles inferiores a la CMI de la cepa HUJEG-1. Además la combinación de MOX y SXT mostró una más importante disminución de la infección en los ratones.

El segundo ensayo (Fig. 16), solo GAT con SXT mostró respuesta estadísticamente significativa, el resto de los medicamentos no dieron por análisis estadístico una buena respuesta. Por lo que podemos concluir que tanto GAT como MOX pueden ser buenas alternativas terapéuticas para el micetoma causado por *Nocardia brasiliensis*.

SEGUNDO ENSAYO

Realizado con SPX+SXT, MOX+SXT, GAT+SXT, MOX y SPX (Fig. 16)

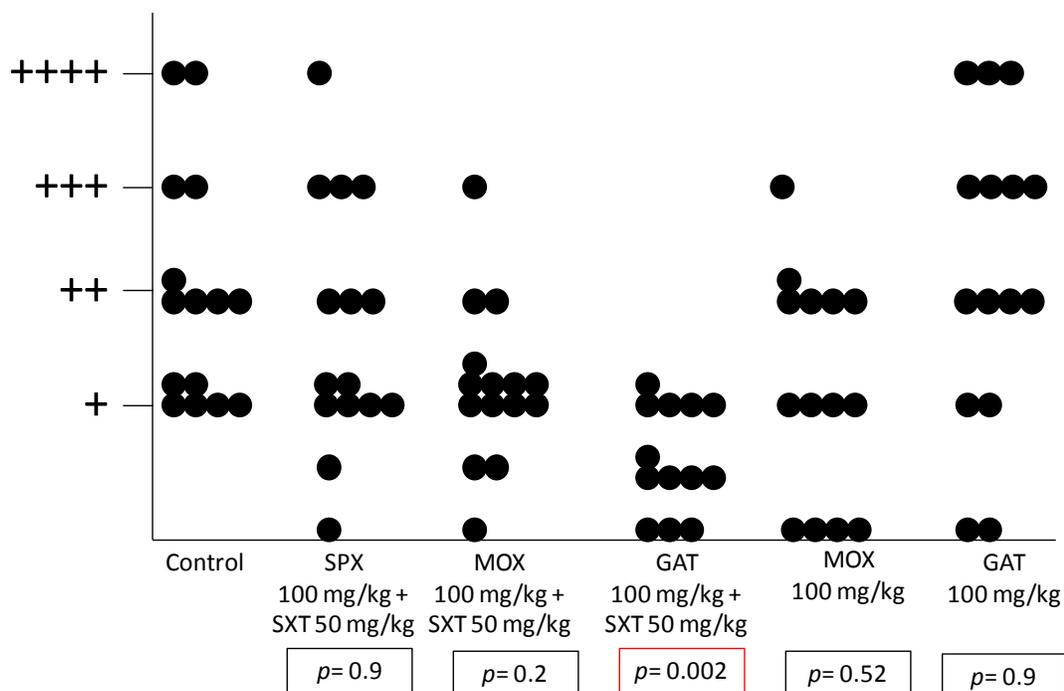


Fig. 16: Resultados del segundo ensayo, se evaluaron los efectos de: SPX (100 mg/kg) + SXT (50 mg/kg), MOX (100 mg/kg) + SXT(50 mg/kg), GAT (100 mg/kg) + SXT (50 mg/kg) y MOX (100 mg/kg), SPX (100 mg/kg). Todos los medicamentos fueron de administración en el agua de beber. Cada círculo representa un ratón hembra BALB/c.

5.- Determinación de las tasas de mutación de *Nocardia brasiliensis* a moxifloxacino, esparfloxacino y ciprofloxacino.

Los resultados se describen en la tabla 4:

Quinolonas	Concentración en agar		
	1X del CMI	4X del CMI	16X del CMI
CIP	5.3×10^{-7}	6×10^{-9}	1×10^{-9}
SPX	$> 1 \times 10^{-9}$	$> 1 \times 10^{-9}$	8×10^{-8}
MOX	4.8×10^{-8}	$< 1 \times 10^{-9}$	$< 1 \times 10^{-9}$
GAT	7.3×10^{-7}	$< 1 \times 10^{-9}$	$< 1 \times 10^{-9}$
SXT	$> 1 \times 10^{-9}$	6.9×10^{-8}	1×10^{-9}
MOX+SXT	3.4×10^{-8}	$< 1 \times 10^{-9}$	$< 1 \times 10^{-9}$
GAT+SXT	2×10^{-9}	$< 1 \times 10^{-9}$	$< 1 \times 10^{-9}$

Tabla 4: Tasa de mutación de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 ante diferentes quinolonas

- Cambios en CMI (resistencias bacterianas):

Quinolonas	Concentración en agar	
	CMI original	CMI post exposición
CIP	4 µgr/ml	> 64 µg/ml (n=6 de 8x)
SPX	16 µg/ml	>64 µg/ml (n=6 a 1X)
MOX	0.25 µg/ml	16 µg/ml (n=5 de 8X) y 32 µg/ml (n=1 de 8x)
GAT	0.25 µg/ml	16 µg/ml (n=6 de 8X)
SXT	2.3/0.12 µg/ml	2.3/0.12 µg/ml (n=6 de 8X)

Tabla 5: Cambios en las CMI post exposición a los antimicrobianos. (Resistencia bacteriana). Aquí observamos la CMI basal de los antimicrobianos en la primera columna y en la segunda el cambio presentado en las cepas aisladas de las patas de ratón. Además entre paréntesis el número de cepas aisladas en cada grupo.

Para esto, se realizaron las CMI con las cepa HUJEG-1, con la cual verificamos el CMI ya previamente establecido. Las cepas que aislamos de las patas de los ratones les realizamos el procedimiento descrito en las páginas 25-26. Las que crecieron en estas placas de agar se les realizó de nuevo la CMI y se observó había cambiado. Con los resultados, observamos que con los 4 medicamentos probados en este ensayo, *Nocardia brasiliensis* tiene la capacidad de mutar o al menos crear algún mecanismo de defensa contra estos antibióticos, lo que las hace poder desarrollarse, aun en concentraciones altas de antibiótico. Sin embargo los medicamentos que presentaron menor número de cepas mutadas fueron GAT y MOX, por lo que de nuevo nos lleva a pensar que son una buena alternativa terapéutica para esta enfermedad. Sin embargo, al presentar algún grado de mutación, hay que considerar que tal vez en un tratamiento ya en un paciente, no se presente la respuesta adecuada, ya sea parcial o nula, debido a la mutación natural como mecanismo de defensa de las bacterias o por dejar lapsos de tiempo con niveles disminuidos o ausentes de medicamento. SXT no presentó cambios ya que como mencionamos anteriormente es bacteriostático, no bactericida, por lo que en este ensayo, no hubo crecimiento bacteriano

6.- Determinación en las cepas resistentes a CIP, MOX y GAT la presencia de cambios genéticos en el gen *gyrA*.

Se realizó la purificación del DNA y se colocaron las muestras en el gel y se obtuvieron los siguientes resultados ilustrados en la figura 17:

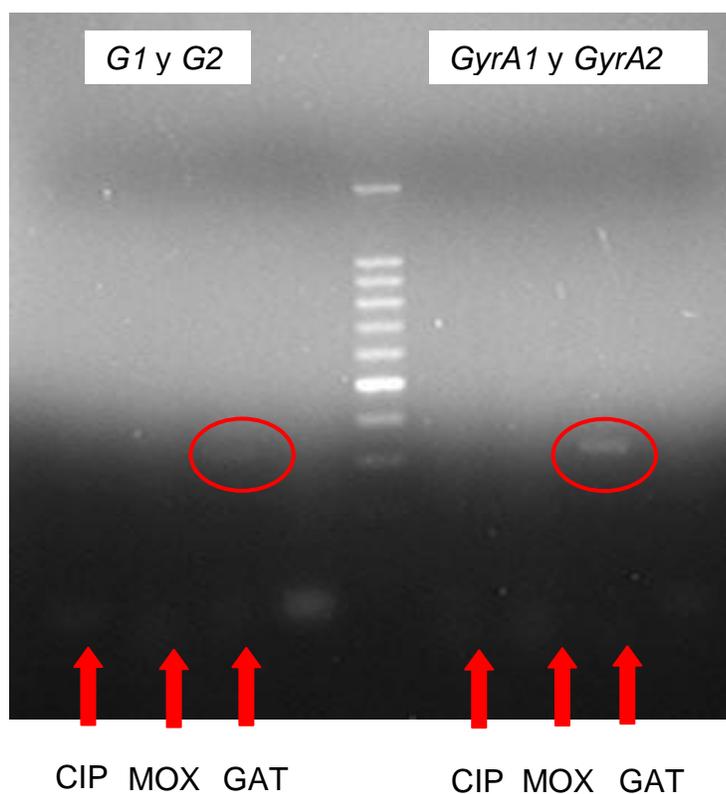


Fig. 17: Gel de agarosa para G1-G2 y *GyrA1-GyrA2* para CIP, MOX y GAT. En círculos se encuentran las barras que aparecieron en el gel.

Cada una de las barras del centro equivale a 100 pb y GAT corrió a 320 pb tanto en primers *GyrA* y G.

Las bandas que fueron obtenidas para GAT en este ensayo se les realizó una secuenciación genética. Al tener el resultado se correlacionaron las secuencias genéticas obtenidas por nosotros, con la secuencia genética de *GyrA*. No hubo una coincidencia de las bases, por lo que concluimos que el segmento que logramos amplificar no es el QRDR. La mutación no se encuentra en este segmento, habrá que seguir investigando otros sitios del DNA para localizar la mutación de *Nocardia brasiliensis*.

DISCUSIÓN

El micetoma es una entidad frecuente en México y que siempre ha resultado en un reto terapéutico. Su presentación es con un aumento de volumen de la zona afectada, con microabscesos y fístulas que drenan material purulento que contiene microcolonias. Actualmente contamos con pocos medicamentos útiles para el tratamiento, esto tal vez porque no existe un medicamento que actúe a nivel intra y extracelular. Además, la posología y los efectos colaterales que se presentan con estas drogas no son los ideales para los pacientes. Por este motivo constantemente se buscan alternativas de tratamiento para el micetoma causado por *Nocardia brasiliensis*. Las quinolonas han demostrado tener actividad contra infecciones por actinomicetos aerobios (29, 30, 31, 49, 50). Existen reportes de que CIP tiene actividad contra diversas especies de *Nocardia* y de micobacterias (49, 50). Además hay múltiples estudios de MOX y GAT contra *Nocardia* (29, 30). En este trabajo pudimos probar *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* la efectividad de los medicamentos contra *Nocardia brasiliensis*. Al revisar los efectos *in vitro* de los medicamentos observamos que CIP presentaba una CMI alta en comparación con el resto de las quinolonas, si se toma en cuenta además la insuficiente concentración plasmática del medicamento, nos llevó a predecir que su actividad en los

ensayos en ratones iba a ser limitada, lo cual lo pudimos observar al carecer de efectividad para disminuir el desarrollo de la infección. Esto descarta a CIP como una posibilidad de tratamiento para esta entidad. MOX es una quinolona con muy buena actividad contra micobacterias, el cual es un organismo intracelular, por lo que consideramos que podía ser una buena alternativa terapéutica contra *Nocardia* que también es intracelular. Su CMI y su concentración plasmática por arriba de la misma por periodos largos (8-12 hrs) nos orientó a observar también que presentó una buena respuesta en la infección en los ratones. Otra ventaja de este medicamento es que en el ensayo en macrófagos mostró respuesta, presentando una disminución de la cantidad de bacteria intracelular al aumentar la cantidad de medicamento administrado de acuerdo al CMI, con lo que observamos que tiene actividad intracelular. Si esta medicamento lo sumamos a algún otro, como SXT, que ya es conocido que funciona contra esta entidad, podríamos estar potenciando el resultado y obtener mejores respuesta para los pacientes. Las concentraciones en plasma de MOX en humanos alcanzan a ser de hasta 6.13 $\mu\text{g/ml}$ con una dosis de 400 mg al día, y se puede mantener por 8 hrs a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$, esto resulta alentador, ya que el CMI de *Nocardia brasiliensis* es de 0.25 $\mu\text{g/ml}$ y la concentración alcanzada por MOX en sangre es muy superior a este valor y se mantiene arriba de 1 $\mu\text{g/ml}$ por hasta 8 hrs, lo que nos dice que los pacientes con micetoma causado por *Nocardia brasiliensis*, presentarían una concentración de medicamento superior al CMI por hasta 8 hrs, manteniéndose en sangre hasta 12 hrs. La posología podría ser de 400 mg cada 12 hrs y el paciente estaría cubierto con medicamento circulando las 24 hrs para evitar

dejar lapsos sin medicamento que pudieran permitir el desarrollo de resistencia a esta droga.

SPX a pesar de parecer prometedor por reportes previos contra *Mycobacterium tuberculosis* (37,38,39), tanto *in vitro*, como *in vivo* y con actividad intracelular en macrófagos no mostró, al igual que CIP, ninguna posibilidad para ser considerados una opción terapéutica. Esto debido a que los concentraciones plasmáticas obtenidas para estas dos quinolonas no alcanzan ni siquiera el CMI de *Nocardia brasiliensis* para cada una de ellas (CMI de CIP 4 µg/ml y SPX 16 µg/ml). Al administrar estos medicamentos, aunque fuera a las dosis máximas para los humanos no alcanzamos niveles que sean terapéuticos, por lo que no es suficiente para combatir a la bacteria y el micetoma se continuaría desarrollando por falta de medicamento para combatirlo.

GAT es un excelente medicamento contra tuberculosis (34) y hay estudios *in vivo* contra *Nocardia brasiliensis* (30). Presenta buena respuesta *in vitro*, *in vivo* y en el ensayo en macrófagos. Además existen las concentraciones plasmáticas de GAT en humanos alcanza a una dosis de 400 mg, una concentración máxima de 2.9 µg/ml, manteniéndose por arriba de 1.66 µg/ml hasta por 7.2 hrs (52). Esta concentración está por arriba de la CMI de *N. brasiliensis*, igual que como pasa con MOX. Sin embargo como con GAT se han presentado disglucemias en los pacientes bajo tratamiento, hay que tener en consideración las comorbilidades que puedan presentar los pacientes, como por ejemplo diabetes, antes de prescribir este medicamento, además de tener a los pacientes monitorizados de una manera correcta para evitar una complicación. A pesar de mostrar tan buena respuesta en los ensayos

realizados y la literatura previa, faltan tanto de MOX como de GAT mayores estudios incluyendo ensayos clínicos en pacientes, antes de poder establecerlos como una alternativa de tratamiento para esta entidad.

Considero que MOX y GAT son buenas opciones como tratamiento contra el micetoma causado por *Nocardia brasiliensis*, a una dosis de 400 mg cada 12 hrs, dadas sus farmacocinéticas. Esta posología tratando de evitar lapsos de tiempo sin medicamento circulante, para evitar la mutación natural que pueden llegar a desarrollar las bacterias ante los antimicrobianos.

CONCLUSIONES FINALES

En este estudio, encontré que GAT y MOX son buenas opciones terapéuticas para el micetoma causado por *Nocardia brasiliensis*, con buena respuesta *in vitro* e *in vivo* y con concentraciones plasmáticas a niveles adecuados contra este microorganismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- **Carter, H.** On a new striking form of fungus disease principally affecting the foot and prevailing endemically in many parts of India. Trans Med Phys Soc Bombay. 6:104-142 (1860).
- 2.- **Carter, H.** On mycetoma or the fungus disease in India. J & A Churchill. Londres. (1874).
- 3.- **Pinoy, E.** Actinomycoses and mycetomes. Bull Inst Pasteur. 11: 929-938 (1913).
- 4.- **Rodriguez-Nava V, Couble A, Molinard C, Sandoval H, Boiron P, Laurent F.** *Nocardia mexicana* sp. nov., a new pathogen isolated from human mycetomas. J Clin Microbiol. 42:4530-5 (2004).
- 5.- **Lavalle, P.** Clínica y terapéutica de los micetomas. Dermatol. Inter. 5: 117-120 (1966).
- 6.- **Conde, C., Melendro, E., Fresán, M., Ortiz-Ortiz, L.** *Nocardia brasiliensis*: mycetoma induction and growth cycle. Infect. Immun. 38: 1291-1295 (1982).
- 7.- **Vera-Cabrera, L., Johnson, W., Welsh, O., Reséndiz-Uresti, F., Salinas-Carmona, M.** Distribution of a *Nocardia brasiliensis* catalase gene fragment in members of the genera *Nocardia*, *Gordona*, and *Rhodococcus*. J. Clin. Microbiol. 37: 1971-1976 (1999).
- 8.- **Couple, A., Rodríguez-Nava, V., Pérouse, M., Boiron, P., Laurent, F.** Direct detection of *Nocardia* spp. in clinical samples by a rapid molecular method. J. Clin. Microbiol. 43: 1921-1924 (2005).

- 9.- **Conville, P., Fischer, S., Cartwright, C., Witebsky, F.** Identification of *Nocardia* species by restriction endonuclease analysis of an amplified portion of the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 38: 158-164 (2000).
- 10.- **Dorman, S., Guide, S., Conville, P., DeCarlo, E., Malech, H., Gallin, J., Witebsky, F., Holland, S.** *Nocardia* infection in chronic granulomatous disease. *CID.* 35: 390-394 (2002).
- 11.- **Folb, P., Jaffe, R., Altmann, G.** *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis* infections in mice. *Infec. Immun.* 13: 1490-1496 (1976).
- 12.- **López, R., Méndez, L., Lavalle, P., Welsh, O., Saúl, A., Macotela, E.** Epidemiología del micetoma en México: estudio de 2105 casos. *Gac. Med. Mex.* 128: 477-481 (1992).
- 13.- **Cantú-Garza, HA.** Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con micetoma en la consulta de Dermatología del Hospital Universitario "José E. González", periodo 1990-2003. Tesis de Especialidad. Facultad de Medicina UANL (2004).
- 14.- **Williams, T., Sharpe, M.E., Holt, J.G.** Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 4. EUA. Williams & Wilkins Co. 2333-2362 (1989).
- 15.- **McNeil, M., Brown, J.** The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Reviews.* 357-417 (1994).
- 16.- **Kwapinski, JB., Seelinger, HPR.** Investigations on the antigenic structure of actinomycelates: IX serological classification of the *Nocardiae* with the polysaccharide fractions of their cell walls. *Mycopathol.* 25: 173-782 (1965).
- 17.- **Daoud, M., Ezzine, S., Badri, T., Mokhtar, I., Fazaa, B., Kamoun, M.** Mycetoma: retrospective study of 13 cases in Tunisia. *Acta Dermatoven.* 14: 153-156 (2005).
- 18.- **Curry, W.** Human nocardiosis, a clinical review with selected case reports. *Arch Intern Med.* 140: 819-826 (1980).
- 19.- **González-Ochoa, A.** Mycetoma by *Nocardia brasiliensis*. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. trop.* 22: 15-24 (1962).

- 20.- **Laurent, F., Provost, F., Boiron, P.** Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37: 99-102 (1999).
- 21.- **Welsh, O., Salinas, M., Rodríguez, M.** Mycetoma. *Infectious diseases. Estados Unidos.* J.B. Lippincott. Quinta edición. 1402-1406 (1994).
- 22.- **Bojalil, L., Cerbon, J.** Schema for the differentiation of *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis*. *Mycopathol.* 78: 852-957 (1959).
- 23.- **Welsh, O.** Mycetoma. Current concepts in treatment. *Int. J. of Dermatol.* 30: 387-98 (1991).
- 24.- **Vera-Cabrera L, Gonzalez E, Choi SH, Welsh O.** In vitro activities of new antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 602-4 (2004).
- 25.- **Gómez-Flores, A., Welsh, O., Said-Fernández, S., Lozano-Garza, G., Vera-Cabrera, L.** *In Vitro* and *In Vivo* activities of antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 832-837 (2004).
- 26.- **Vera-Cabrera, L., González, E., Choi, S., Welsh, O.** *In Vitro* activities of new antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 602-604 (2004).
- 27.- **Welsh, O., Salinas, M.C.** Mycetoma. *Infectious Diseases* 5^a Ed. (1994).
- 28.- **Vera-Cabrera, L., Gómez-Flores, A., Escalante-Fuentes, W., Welsh, O.** *In Vitro* activity of PNU-100766 (Linezolid), a new oxazolidinone antimicrobial, against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 3629-3630 (2001).
- 29.- **Miyazaki, E., Miyazaki, J., Chen, R., Chaisson, R., Bishai, W.** Moxifloxacin (BAY12-8039), a new 8-methoxyquinolone, is active in a mouse model of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 85-89 (1999).
- 30.- **Daw-Garza A, Welsh O, Said-Fernández S, Lozano-Garza HG, Waksman de Torres N, Rocha NC, Ocampo-Candiani J, Vera-Cabrera**

- L. *In vivo* therapeutic effect of gatifloxacin on BALB/c mice infected with *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:1549-50 (2008).
- 31.- **Yoshimatsu, T., Nuermberger, E., Tyagi, S., Chaisson, R., Bishai, W., Grosset, J.** Bactericidal activity of increasing daily and weekly doses of moxifloxacin in murine tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 1875-1879 (2002).
- 32.- **Kanemitsu, K., Kunishima, H., Saga, T., Harigae, H., Ishikawa, S., Takemura, H., Kaku, M.** Efficacy of amikacin combinations for nocardiosis. *J Exp. Med.* 201: 157-163 (2003).
- 33.- **Fattorini, L., Tan, D., Iona, I., Mattei, M., Giannoni, F., Brunori, L., Recchia, S., Orefici, G.** Activities of moxifloxacin alone and in combination with other antimicrobial agents against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infection in BALB/c Mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 360-362 (2003).
- 34.- **Alvarez-Freites, E., Carter, J., Cynamon, M.** *In vitro* and *in vivo* activities of gatifloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 1022-1025 (2002).
- 35.- **Efthimiadou, E., Sanakis, Y., Raptopoulou, C., Karaliota, A., Katsaros, N., Psomas, G.** Crystal structure, spectroscopic, and biological study of the copper (II) complex with third-generation quinolone antibiotic sparfloxacin. *Bioorg Med Chem Lett.* 16: 3864-3867 (2006).
- 36.- **Schentag, J.** Sparfloxacin: A review. *Clin. Ther.* 22: 372-387 (2000).
- 37.- **Talath, S., Gradad, A.K.** Synthesis, antibacterial and antitubercular activities of some 7-[4-(5-amino-[1,3,4]thiadiazole-2-sulfonyl)-piperazin-1-yl] fluoroquinolonic derivatives. *Eur. J Med. Chem.* 41: 918-924 (2006).
- 38.- **Bhusal, Y., Shiohidra, C., Yamane, N.** Determination of *in vitro* synergy when three antimicrobial agents are combined against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J Antimicrob. Agents.* 26: 292-297 (2005).
- 39.- **Devinder, K., Khuller, G.K.** *In vitro*, *ex vivo* and *in vivo* activities of etambutol and sparfloxacin alone and in combination against *Mycobacteria*, *Int. J Antimicrob. Agents.* 17: 51-55 (2001).

- 40.- **Filice, G., Beaman, B., Remington, J.** Effects of activated macrophages on *Nocardia asteroides*. *Infect. Immun.* 27: 643-649 (1980).
- 41.- **Beaman, B., Smathers, M.** Interaction of *Nocardia asteroides* with cultured rabbit alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 13: 1126-1131 (1976).
- 42.- **Black, C., Beaman, B., Richard, D., Goldstein, E.** Intracellular acid phosphatase content and ability of different macrophages populations to kill *Nocardia asteroides*. *Infect. Immun.* 47: 375-383 (1985).
- 43.- **Park, J., Henao, M., González-Juarrero, M., Orme, I., Ordway, D.** Virulent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages. *J Leuko. Biol.* 79: 1-7 (2006).
- 44.- **Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M., Liu, Y., Mangan, J., Monahan, I., Dolganov, G., Efron, B., Butcher, P., Nathan, C., Schoolnik, G.** Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: insights into the phagosomal environment. *J Exp. Med.* 198: 693-704 (2003).
- 45.- **Mariotti, S., Teloni, R., Iona, E., Fattorini, L., Romagnoli, G., Gagliardi, M., Orefici, G.** *Mycobacterium tuberculosis* diverts alpha interferon-induced monocyte differentiation from dendritic cells into immunoprivileged macrophage-like host cells. *Infect. Immun.* 72: 4385-4392 (2004).
- 46.- **Giacomini, E., Iona, E., Ferroni, L., Miettinen, M., Fattorini, L., Orefici, G., Julkunen, I., Coccia, E.** Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J Immun.* 166: 7033-7041 (2001).
- 47.- **Davis-Sibienski, C., Beaman, B.** Interaction of *Nocardia asteroides* with alveolar rabbit macrophages: effect of growth phase and viability on phagosome-lysosome fusion. *Infect. Immun.* 29: 24-29 (1980).
- 48.- **González-Ochoa, A.** Producción experimental del micetoma por *Nocardia brasiliensis* en ratón. *Gac. Med. Mex.* 99: 773-781 (1969).

- 49.- **Alangaden, G. J., S.A. Lerner.** The clinical use of fluorquinolones for the treatment of mycobacterial diseases. *Clin and Infect. Dis.* 25: 1213-1221 (1997).
- 50.- **Bath, P. M., K. W. Pettingale, and J. Wade.** Treatment of multiple subcutaneous *Nocardia asteroides* abscesses with ciprofloxacin and doxycycline. *Post Med Journal.* 65:190–191 (1989).
- 51.- **Vera-Cabrera, L., Espinoza-Gonzalez, N.A., Welsh, O., Ocampo-Candiani, J., Castro-Garza, J.** Activity of novel oxazolidinones against *Nocardia brasiliensis* growing within THP-1 macrophages. *J Antimicrob Chemother.* 64:1013-7 (2009).
- 52.- **Naber, C., Steghafner, M., Kinzig-Schippers, M., Sauber, C., Sörgel, F., Stahlberg, H., Naber, C.** Concentrations of gatifloxacin in plasma and urine and penetration into prostatic and seminal fluid, ejaculate, and sperm cells after single oral administrations of 400 milligrams to volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 293–297 (2001).
- 53.- **Pestova, E., Millichap, J., Noskin, G., Peterson, L.,** Intracellular targets of moxifloxacin: a comparison with other quinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 583-590 (2000).

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Brenda Edith Chacón Moreno

Candidato para el Grado de

Doctorado en Medicina

Tesis: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE QUINOLONAS EN EL MICETOMA EXPERIMENTAL POR *Nocardia brasiliensis* EN RATONES BALB/c

Campo de Estudio: Medicina

Biografía:

Datos Personales: Originaria de Monterrey, Nuevo León. Fecha de nacimiento el 12 de Abril de 1978, hija del Dr. med. Hernan Chacón Martínez y Marcia Laura Moreno Przespolewzqui.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Médico Cirujano y Partero en 2001. Especialidad en Dermatología en el Hospital Universitario Dr. José E. González (2004-2008). Miembro de la Academia Mexicana de Dermatología desde 2008, de la Sociedad de Dermatología de Nuevo León desde 2008 y del CILAD desde 2007.

APENDICE A

PREPARACION DE MEDIOS Y REACTIVOS

1.- **Caldo Muller-Hilton ajustado con cationes:** (Oxoid, CM0337, Basingstoke, Hampshire, England). Se pesaron 35 g de polvo de caldo Muller-Hilton y se agregaron 1.4 lt de agua bidestilada, se disolvió bien esta mezcla y se filtró pasándola por papel filtro. Se esterilizó con calor húmedo por 15 min a 121°C (Thermo Scientific ST 75920-33, Harvey SaterileMax, Debuke, Iowa, EU) y se dejó enfriar toda una noche. Ya a temperatura ambiente la mezcla se le agregaron los cationes. De acuerdo a los cálculos para una solución de 1.4 lt corresponden 1.4 ml de MgCl₂ (se disolvieron 1 ml de MgCl₂ por litro de agua bidestilada y se tomaron 1.4 ml) y 2.8 ml de CaCl₂ (se disolvieron 2 ml de CaCl₂ en un litro de agua bidestilada y se tomaron 2.8 ml). Se colocó la mezcla en los recipientes de almacenaje y se refrigeró.

2.- **Agar BHI** (BD Bioxon, 214700, Edo. De México, Mex.): se pesaron 37 grs de medio con 1 lt de agua bidestilada, se agitó para disolverlo bien y se esterilizó a

121°C por 15 min y se dejó enfriar un poco antes de ser colocado en las placas y dejar enfriar por completo el medio.

3.- **Agar sabouraud** (BD Bioxon, 210700, Edo. De México, Mex): Para prepararlo se pesaron 65 grs de medio y se disolvieron en 1 lt de agua bidestilada, se esterilizó a 121°C por 15 min y se dejó enfriar dentro de las placas a utilizar.

4.- **Caldo agar BHI** (BD Bioxon, 214700, Edo. De México, Mex.): se pesaron 37 grs de medio con 1 lt de agua bidestilada, se agitó para disolverlo bien y se esterilizó a 121°C por 15 min y se dejó enfriar en los matraces en los que se utiliza.

5.- **RPMI 1640** (Gibco-BRL, Grand Island, NY, EU): para preparar 50 lt pesamos 519.6 grs, por consiguiente para preparar 0.5 lt, pesamos 5.196 grs. Se le agregó la cantidad de agua indicada, el agua debe de ser libre de pirógenos y filtramos la solución pasándola por un Stericup® (Milipore Express Plus, Sterile Vacuum Filter Unit, SCGPV05RE, Bedford, MA, EU) para dejarla completamente estéril.

6.- **PBS (solución amortiguadora con fosfato 0.15 M)**: Se pesaron: 8 gr de NaCl (0.14 M), 1.22 gr de Na₂HPO₄ o 2.9 gr de Na₂HPO₄ 12H₂O, 0.2 gr de KH₂PO₄ (0.0014 M) o 0.265 gr de K₂HPO₄3H₂O, 0.2 gr de KCl (0.0026 M); se agregaron 700 ml de agua bidestilada y se agitó bien la solución hasta quedar

bien disueltos los compuestos. Se revisó el pH, ya que debe de estar entre 7.2 y 7.4, se neutralizó agregando HCl o NaOH, al llegar al pH deseado se aforó a 1 lt.

7.- **Gel de agarosa al 1%:** Se pesaron 0.45 grs del polvo de gel de agarosa y se colocaron en un matraz de vidrio de 200 ml y se le agregaron 30 ml de TAE 1X, se calentó para lograr una buena disolución del polvo hasta no observar grumos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se le colocó el bromuro de etilio, con el cual se tiene precaución porque es carcinogénico. Se colocaron 1.5 μ l y se mezcló.

8.- **Azul alamar** (Trek Diagnostics Systems, Cleveland, OH, EU): disolvemos tomando 1 ml de azul alamar y agregarle 9 ml de medio LH (Sigma).