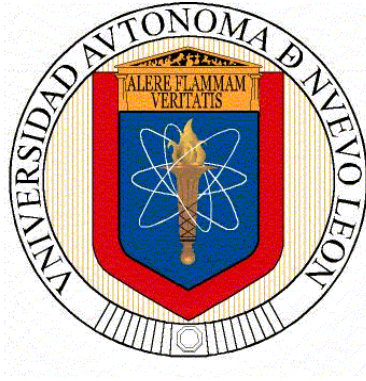


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA DROGA SOBRE
NOCARDIA BRASILIENSIS: BENZOTIAZINONAS**

**POR
DRA. NORMA ALEJANDRA GONZÁLEZ MARTÍNEZ**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN MEDICINA**

MAYO, 2023

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE
NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA DROGA
SOBRE NOCARDIA BRASILIENSIS:
BENZOTIAZINONAS**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL
GRADO DE**

DOCTOR EN MEDICINA

Por

DRA. NORMA ALEJANDRA GONZÁLEZ MARTÍNEZ

Mayo, 2023

**EVALUACIÓN DE UNA NUEVA DROGA
SOBRE NOCARDIA BRASILIENSIS:
BENZOTIAZINONAS**

Aprobación de la tesis:

**Dr. C. Lucio Vera Cabrera
Director de tesis**

**Dr. Med. Jorge Ocampo Candiani
Co- Director de Tesis**

**Dra. Med. Minerva Gómez Flores
Coordinador de Enseñanza**

Dra. C. Carmen Amelia Molina Morales Torres

Dra. C. Anna Velia Vázquez Marmolejo

**Dr. med. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ
Subdirector de Estudios de Posgrado**

AGRADECIMIENTOS

Le doy Gracias principalmente a Dios que me dio talentos y me permite desarrollarnos.

A Oliver, mi esposo, mi amor y maestro constante. Me enseña a tener objetivos claros y fijos.

Agradezco a mis padres que son amor, luz, fuerza y energía.

A mis hermanos Pepe y Roberto, ustedes son mis amigos, mis cómplices. Siempre me recuerdan como luchar por lo que se desea y lo sencilla que es la vida.

A mis abuelos maternos y paternos. En especial a mamá Licha que me enseñó a tener carácter y respeto en mí misma y a los demás.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Lucio Vera, maestro incondicional. Por su paciencia y el amor que le tiene a la enseñanza e investigación.

A mis maestros, Dr. Med. Jorge Ocampo y Dra. Med. Minerva Gómez por alentarme a la superación. Por saber escuchar.

Al personal del Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica; Dra. C. Carmen Molina, QFB. Anabel Gallardo, QFB. Wendy Escalante, MC. Paola Rivera.

Al personal del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS, y del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la UANL, en especial a la Dra. Norma Cavazos y al MVZ Gerardo Lozano Garza, por su consejo, apoyo paciencia y dedicación.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I		Página
1. RESUMEN		9
Capítulo II		
2. INTRODUCCIÓN		10
Capítulo III		
3. HIPÓTESIS		21
Capítulo IV		
4. OBJETIVOS		22
Capítulo V		
5. MATERIAL Y MÉTODOS		24
Capítulo VI		
6. RESULTADOS		33
Capítulo VII		
7. DISCUSIÓN		42
Capítulo VIII		
8. CONCLUSIONES		46
Capítulo IX		
9. BIBLIOGRAFÍA		47
Capítulo X		
10. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO		58

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Concentración mínima inhibitoria de BTZ-11026169 y BTZ-10526043	33
2. Concentración mínima inhibitoria de BTZ-10526043 y P-824	33
3.	

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pagina
Figura 1. Blanco terapéutico de la BTZ	19
Figura 2. Estructura química de BTZ 043	25
Figura 3. Estructura química de BTZ 169	26
Figura 4. Escala para medición de lesiones producidas por <i>N. brasiliensis</i> en el modelo experimental murino.	38
Figura 5. Grupo control (-): TMP/SMX.	40
Figura 6. Grupo de (+): Solución Salina	40
Figura 7. Grupo tratamiento: BTZ 043	41
Figura 8. Grupo tratamiento: BTZ 169	41

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
Gráfica 1. Ensayo con macrófagos THP-1.	34
Gráfica 2. Concentración plasmática de PBTZ 169 en ratones BALB/c.	35
Gráfica 3. Concentración plasmática de BTZ 043 en ratones BALB/c.	36
Gráfica 4. Concentración plasmática de TMP/SMX en ratones BALB/c.	37
Gráfica 5. Evaluación al final de las 10 semanas de tratamiento en ratones BALB/c.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

BALB/c el laboratorio de la especie Mus musculus	Variedad de ratón albino criada en el laboratorio de la especie Mus musculus
BHI	Brain Heart Infusion
Btz	Benzotiazinonas
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
Gr	gramos
HPLC Resolución	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IMSS Social	Instituto Mexicano del Seguro Social
Kg	Kilogramos
LIID Investigación Dermatológica	Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica
MF	Mc Farland
mg	miligramo
min	minutos
ml	mililitro
OMS	Organización Mundial de la Salud
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TMP/SMX	Trimetoprim/Sulfametoxazol
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

RESÚMEN

Título del Estudio: **EVALUACIÓN DE UNA NUEVA DROGA SOBRE NOCARDIA BRASILIENSIS: BENZOTIAZINONAS**

Número de páginas: 58

Candidato para el grado de Doctor en Medicina

Área de Estudio: Medicina

Propósito y Método del Estudio: *Nocardia brasiliensis* es un Actinomiceto aeróbico y es el agente causal más frecuente del micetoma. El micetoma es una enfermedad sucutánea-crónica que tiene como distribución principal las áreas tropicales y subtropicales (India, México, Arabia Saudita, Venezuela, Yemen, África). Se presenta principalmente en masculinos durante su edad laboral. Frecuentemente en extremidades inferiores. Manifestación clínica: es por abscesos y fístulas no dolorosos. El inóculo se realiza por traumatismos menores con astilla o madera o bien con cualquier material que contenga el agente. Actualmente existen esquemas antibióticos con eficacia parcial y con eventos adversos potencialmente graves. El propósito de este estudio es evaluar la eficacia de las Benzotiazinonas 043 y 169 (PBTZ-043 y PBTZ – 169) sobre *N. brasiliensis*. Se realizaron estudios *In Vitro* e *In Vivo*. Estudio *In Vitro*: Determinación de la sensibilidad *in vitro* de aislamientos clínicos cepas de *Nocardia brasiliensis* a BTZ 169, PBTZ 043 y PA 824 (Concentración Mínima Inhibitoria). Determinación del efecto de PBTZ 169 y DA 7218 sobre macrófagos infectados con *Nocardia brasiliensis*. Estudio *In Vivo*: determinación de vida media en modelo murino y ensayo, así como su vida media en ratones Balb/c y Ensayos in vivo en ratones BALB/c

Conclusiones: Solamente la PBTZ169 mostró eficacia terapéutica.

II

INTRODUCCIÓN

El micetoma es una enfermedad subcutánea crónica, de etiología múltiple, causada por hongos verdaderos (eumicetoma) o por actinomicetos aeróbicos (actinomicetoma), siendo estos últimos los más frecuentemente reportados (1, 5, 8). Se observa más frecuentemente en regiones tropicales y sub-tropicales; entre las latitudes 15°s y 30°n (1, 21, 39) Los actinomicetales productores de micetoma se agrupan en tres géneros con diferentes especies: *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia asteroides*, *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri* y *Streptomyces somaliensis*. Los agentes causales del eumicetoma son entre otros, *Madurella mycetomatis*, *Madurella grisea* y *Pseudallescheria boydii* (1, 43).

La enfermedad fue descrita por primera vez por Gill en el año de 1842, en un distrito de la India llamado Madura (32. 43), de ahí los términos maduromicetoma y los géneros *Madurella* y *Actinomadura* (32).

El micetoma es una infección que afecta la piel, el tejido subcutáneo, los huesos y diversos órganos. Ocurre tras la penetración transcutánea del agente etiológico en sus formas infectantes a través de heridas y áreas de traumatismo (1).

Clínicamente se caracteriza por una tumefacción de la región anatómica afectada, y deformidad de la misma, así como la producción de abscesos y fístulas, las cuales drenan una secreción purulenta que contiene al agente causal. (1, 5, 8, 21, 38)

Epidemiología

El micetoma predomina en el sexo masculino en una proporción 5:1 para todos los agentes excepto para *Actinomadura madurae* donde la relación es 2:3. El grupo de edad más afectado se encuentra entre la segunda y la cuarta década de la vida. El trabajo de campo favorece la alta incidencia entre el sexo masculino.

Los agentes infecciosos se introducen a la piel a través de traumatismos menores con astillas de madera o algún material que contenga los microorganismos; éstos generalmente habitan en la tierra. El área más afectada son las extremidades inferiores (pies con el 70%) seguida de las extremidades superiores (1, 5, 8, 21, 32, 38, 39, 40, 44, 55, 61).

Actualmente esta enfermedad se encuentra distribuida a nivel mundial con predominio en zonas tropicales; siendo más común en India, México, Arabia Saudita, Venezuela, Yemen y un área en “cinturón” en África que se extiende desde Senegal, en la costa oeste, atraviesa Mali, Nigeria, Congo y Sudán hasta Somalia en la costa Este (5, 8).

Otros países con alta endemicidad son: India y Senegal para eumicetomas y México, Centro y Sudamérica, para actinomicetoma (1).

A nivel mundial, alrededor del 60% de los casos de micetoma son de origen actinomicético y alrededor del 40% de origen micótico (1, 8).

En México, el 98% del total de los casos de micetoma son causados por actinomicetos y alrededor del 86% son producidos por *Nocardia brasiliensis*, seguida por *Actinomadura madurae*, la cual se observa en 10% de los casos (1, 8).

En México, los casos de micetoma se distribuyen en dos focos principales: centro-occidental y centro-meridional, predomina en el sur de Guanajuato, norte de Michoacán, parte de Jalisco y Querétaro, sur de Puebla, norte de Oaxaca y Guerrero (1, 38, 39).

En una encuesta realizada en nuestro país (39) para determinar la incidencia del micetoma en México, se obtuvo información de un total de 2,015 micetomas en un periodo de 30 años con una incidencia promedio de 70 casos anuales. De los 2,015 casos, 350 fueron obtenidos del servicio de Dermatología de nuestro hospital. En este estudio los estados con mayor incidencia fueron: Jalisco, Nuevo León, San Luis Potosí (SLP), Morelos y Guerrero (39).

En nuestro hospital, se realizó un estudio (21) en que se realizó la estadística de enero de 1990 a diciembre de 2003 con 101 casos de micetomas tratados en el servicio de Dermatología. Y otra (63) (la más actual) con un periodo de tiempo del 2009 al 2018, en donde se registraron 31 casos. En promedio se reportaron 8 pacientes anuales (21). Del total de pacientes, 42% provenientes del estado 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 SLP y 13% de Tamaulipas. El 25% restante provenían de Zacatecas, Jalisco, Veracruz e Hidalgo (21).

Patogenia

El micetoma se presenta tras la penetración en la piel del agente etiológico en áreas traumatizadas o con heridas (1, 8).

La incidencia es mayor en individuos que trabajan sin calzado en el campo donde los agentes etiológicos y la vegetación rastrera presenta espinas causando así las heridas (1, 8, 38, 39).

Esta infección afecta la piel, y se disemina a través de la fascia y tejido celular subcutáneo hasta invadir y destruir tejido conectivo y hueso, pudiendo diseminarse por la cavidad torácica, la abdominal o por otras regiones del cuerpo. Así mismo, pueden causar pérdida de la función y de manera ocasional, puede llegar a ser fatal (1, 8, 38, 61).

Clínicamente se caracteriza por tumefacción de la región anatómica afectada, con una deformidad de la misma y posteriormente la producción de abscesos y fístulas, los cuales drenan una secreción purulenta, que contiene al agente causal (1).

La primera manifestación es la presencia de una pápula pequeña indolora en planta o dorso del pie, la cual aumenta paulatinamente su volumen y posteriormente la piel se rompe y aparecen nódulos, abscesos y tractos fistulosos en la piel afectada. Estas lesiones se propagan a sitios adyacentes y mientras nuevas lesiones se forman, las antiguas se resuelven y dejan cicatrices (1, 8). La afección ósea depende de la virulencia del organismo infectante y la respuesta inmune del hospedero (57). 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 más temprano (46, 56).

Histológicamente, el agente causal se localiza en los abscesos que están caracterizados por granulomas, que contienen numerosos polimorfonucleares, células gigantes, plasmáticas e histiocitos, algunos de estos organismos pueden ser identificados por su tamaño, color, consistencia y características tintoriales, así como por la presencia de hifas macro o microsifonadas (1, 8).

Los mecanismos de infección de los agentes causales del actinomicetoma han sido estudiados utilizando modelos animales tanto en ratón como en rata. (19, 23, 34, 42, 54).

González-Ochoa y cols. (34), fueron los primeros en desarrollar micetoma experimental en ratones por *N. brasiliensis* observando la formación de granos al inocular la bacteria de manera intraperitoneal. Macotela-Ruiz y Mariat en 1963 produjeron lesiones experimentales al inocular *N. brasiliensis* o *N. asteroides* en cavidad peritoneal o tejido celular subcutáneo de hámster y cobayos (41). En 1969, González-Ochoa produjo micetomas experimentales con éxito en el cojinete plantar de ratones, lo cual representa la vía de entrada de *N. brasiliensis* al tejido humano (34).

Más adelante, Salinas, y cols. desarrollaron micetoma experimental en ratones BALB/c, al inocular una suspensión unicelular de *Nocardia brasiliensis* con 10^7 UFC

por ml. Se inyectaron alícuotas de la suspensión en solución salina en cojinete plantar de los ratones (46).

Welsh-Lozano y cols. desarrollaron micetomas experimentales por *N. brasiliensis* en ratas, las cuales desarrollaron lesiones, pero a los 20 días comenzaron a tener curación espontánea sin aplicación de tratamiento alguno, a diferencia del ratón, en el cual puede desarrollarse una infección crónica. Por lo cual se concluyó que el sistema inmune de las ratas es más eficiente para resolver esta infección (54).

Tratamiento

El tratamiento de los micetomas depende de su etiología. En el caso de los eumicetomas se basa en antifúngicos y tratamiento quirúrgico. En los actinomicetomas el tratamiento se basa en agentes antimicrobianos. (17).

En la terapéutica de los actinomicetomas, inicialmente se emplearon las sulfonamidas (DDS, sulfametoxipiridazina y sulfadoxina), isoniacida, minociclina, imipenem, estreptomina, rifampicina, tetraciclinas, Posteriormente se han reportado casos tratados con combinaciones con amoxicilina/ácido clavulánico y trimetoprim/sulfametoxazol (TMP/SMX) + amikacina e imipenem con buenos resultados (8, 31, 32, 35, 40, 57, 58, 59).

El trimetoprim/sulfametoxazol se ha utilizado en los casos de micetoma no complicados y pequeños. Una de las desventajas es que este esquema terapéutico

debe ser empleado por varios meses incluso años obteniendo solamente una tasa de curación del 70% (TMP/SXT 8 y 40 mg/kg/día) (57, 58, 60).

Hay pacientes que no responden a esta terapia, y en esos casos está indicada la combinación con otros antimicrobianos (58), por ejemplo: al agregar diaminodifenilsulfona durante 1 mes al esquema de TMP/SXT (59). En los casos que no responden a TMP/SXT, puede utilizarse amoxicilina-ácido clavulánico 1.5 g/día durante 6 meses (45). En nuestro Servicio de Dermatología los casos de micetomas extensos, o aquéllos que afecten hueso o tengan tendencia a diseminarse a órganos vecinos, o bien, aquéllos que no responden a este tratamiento se emplea una combinación de amikacina/trimetoprim sulfametoxazol. Con esta combinación se ha obtenido una mejor tasa de curación en un periodo más corto y más alto (95% en una serie de 52 casos de micetoma) (45, 50, 60). El tratamiento combinado se administra en ciclos, denominando un ciclo como el período de la administración simultánea de amikacina (15 mg/kg/día) dividida en 2 dosis diarias por 3 semanas y TMP/SXT (7-35 mg/kg/día) por 5 semanas (60).

La amikacina tiene efectos colaterales principalmente a nivel renal y auditivo (58). A nivel auditivo puede causar una hipoacusia neurosensorial mínima a moderada y a nivel renal una caída en la depuración de creatinina; ambas reacciones adversas requieren de una disminución en la dosis de amikacina. Aunque la disfunción renal es reversible, la hipoacusia puede no serlo (58).

En casos de nocardiosis sistémica, pulmonar o afección a sistema nervioso central la terapia convencional con TMP/SXT resulta poco eficaz y se requiere combinar con otros antimicrobianos como amikacina, imipenem y ceftriaxona (31, 59).

Estos agentes pueden combinarse con una sulfonamida, pero la administración intravenosa por períodos de 6 a 12 meses la hace poco práctica (49).

Sin embargo, debido a la resistencia adquirida de las bacterias a los antimicrobianos y a la nefrotoxicidad y ototoxicidad potenciales con el uso de amikacina, es necesario contar con alternativas terapéuticas que sean eficaces contra el micetoma y con menos efectos adversos.

Gómez-Flores y cols. determinaron la actividad *in vitro* de varios antimicrobianos contra 30 cepas de *Nocardia brasiliensis* (21). Los antimicrobianos probados por el método de difusión en disco que tuvieron efecto en más del 66% de las cepas fueron: linezolid, amikacina, gentamicina, isepamicina, netilmicina, tobramicina, minociclina, amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam, nitroxolina y espiramicina. (21).

En nuestro laboratorio, Gómez-Flores y cols. reportaron la actividad *in vitro* de linezolid, la cual fue comparable a la de la amikacina, trimetoprim/sulfametoxazol y amoxicilina-ácido clavulánico.

Las quinolonas de más reciente desarrollo, tales como gatifloxacino, moxifloxacino y garenoxacino han mostrado una alta actividad inhibitoria *in vitro* ante este microorganismo (4, 7, 25, 36). Las primeras fluoroquinolonas, como ciprofloxacino, tienen un espectro limitado de actividad antibacteriana, principalmente contra microorganismos gram negativos; en cambio las nuevas fluoroquinolonas (moxifloxacino, gatifloxacino, levofloxacino, grepanoxacino, trovafloxacino) con sus

modificaciones químicas logran tener una actividad contra microorganismos gram positivos y anaerobios. (2, 3, 11, 14, 15, 16, 20)

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 (44) como DA 7867 y DA 7218 (19) estos fármacos son de desarrollo reciente desarrollo que presentan excelente respuesta terapéutica *in vitro* e *in vivo* (10, 12, 13, 17-19, 25, 29-31, 38, 48-51, 53).

El antimicrobiano administrado debe ser capaz de penetrar en los tejidos y mantener su actividad bacteriana.

Las benzotiazinonas (1,3-benzothiazin-4-ones, BTZ's) son un antimicrobiano de reciente desarrollo que actúa bloqueando la síntesis de la enzima decaprenil-fosforibosa epimerasa, precursor de los arabinanos de la pared celular. (28). Las benzotiazinonas muestran una excelente actividad contra diversas Corynebacterineae entre ellas *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* and *Nocardia* (27, 28). Las BTZs son particularmente activas contra *Mycobacterium tuberculosis* en concentraciones nanomolares, muy por debajo de rifampicina e isoniazida. El blanco bioquímico-terapéutico de las BTZ, es la decaprenil fosforibose-2'-epimerasa (dprE1) la cual se encuentra distribuida entre las actinobacterias (27, 28, 54).

Debido a la estrecha relación filogenética entre las *Corynebacterineae*, es posible que este antituberculoso sea activo contra *Nocardiae*.

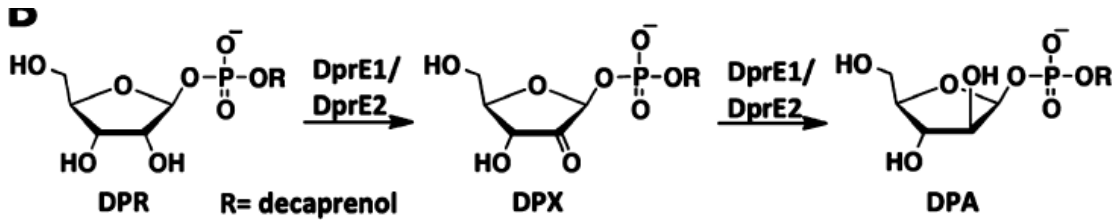


Fig. 1. Blanco terapéutico de la BTZ. La BTZ actúa bloqueando la enzima decaprenil – fosforibosa -2' epimerasa (DprE1).

Importancia

La bacteria como agente causal del micetoma es una enfermedad endémica en nuestro país, y debido al desarrollo de resistencia y/o falta de efectividad de los antimicrobianos empleados y toxicidad secundaria, es importante evaluar la actividad de otros antimicrobianos que puedan aportar información y nuevas herramientas terapéuticas.

Originalidad

Las benzotiazinonas son un antituberculosos de reciente desarrollo del cual no se conoce su desempeño sobre *Nocardia brasiliensis*. En este estudio se pretende analizar si es posible el uso terapéutico contra a *N. brasiliensis*.

III

HIPÓTESIS

Las benzotiazinonas (BTZ) son un nuevo grupo de antifímicos que actúan eficazmente sobre *M. tuberculosis*. Debido a la estrecha relación filogenética entre las Actinobacterias, es posible que las BTZ sean efectivas *in vitro e in vivo* contra *N. brasiliensis*.

IV

OBJETIVO

Objetivo General

Evaluar el efecto terapéutico In vitro e in vivo de PBTZ-11026169 y BTZ-10526043 en *Nocardia brasiliensis*.

Objetivos Específicos

1. Determinar la sensibilidad in vitro de aislamientos clínicos cepas de *Nocardia brasiliensis* a PBTZ 169, BTZ 043 y PA 824 (Concentración Mínima Inhibitoria).
2. Determinar la actividad de BTZ - 11026169 intracelular (macrófagos), frente a *Nocardia brasiliensis*.
3. Determinar la concentración de PBTZ -11026169, BTZ-10526043 en plasma de ratones.

4. Determinación de actividad in vivo de de BTZ -11026169, BTZ-10526043 en el desarrollo normal del micetoma experimental.

V

MATERIALES Y METODOS

Se trata de un estudio experimental in vitro e in vivo de tipo longitudinal, comparativo, prospectivo y no ciego y controlado con placebo.

Recursos biológicos:

1. Cepas de *Nocardia brasiliensis* fueron tomadas del cepario del Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica (LIID).
2. Línea celular de monocitos humanos THP-1. Es una línea celular de monocitos humanos originados de un paciente con leucemia monocítica aguda (ATCC TIB-202). Esta línea celular crece en suspensión y al añadirsele 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. Grupos de ratones BALB/c hembras de entre 8 a 12 semanas de edad.

Recursos materiales:

1. Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica
2. Laboratorio de la División de Biología Celular y Molecular del centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Medicamentos:

1. Benzotiazinonas (1,3-benzothiazin-4-uno). PBTZ -11026169 y BTZ-10526043 fueron proporcionados por el Global Health Institute, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland.
2. DA-7218 ((R)-3(4-(2-(2-metiltetrazol-5-i)-piridin-5-i)-3-fluorofenil)-2-oxo-5-oxazolidril) metildifosfato de sodio), fue proporcionado por Dong-A-Pharm (Corea del Sur).
3. Trimetoprim/Sulfametoxazol fue adquirido en Sigma Chemical Products y de manera comercial a una dosis de 40/200 mg.

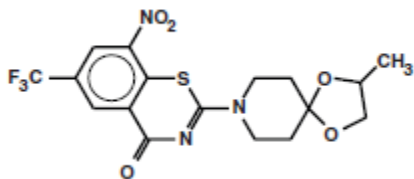


Fig 2. Estructura química de BTZ 043

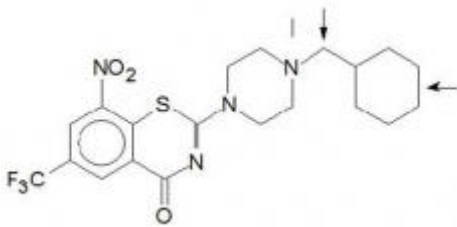


Fig 3. Estructura química de BTZ 169

Determinación de la sensibilidad *in vitro* de aislamientos clínicos cepas de *Nocardia brasiliensis* a PBTZ 169, BTZ 043 y PA 824 (Concentración Mínima Inhibitoria).

- Se evaluó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los medicamentos antes mencionados sobre 30 cepas de *N. brasiliensis*. Para cada medicamento se realizaron placas de microtitulación con diluciones seriadas de 1µg a 0.0002µg/ml, un control positivo de infección y uno negativo sin presencia de *Nocardia*. La realización de este procedimiento se basó en el documento M24-A del CLSI.

Se tomó una colonia de *Nocardia brasiliensis*, se maceró, y se ajustó a 1 MF. De este vial se tomó 0.1 ml y se colocó en cada pozo de la microplaca. Se incubó a 37° y se tomó una lectura provisional a las 24 hrs. obteniendo la lectura definitiva a las 48 hrs. Se empleo esta técnica con diversas cepas (30 cepas) de *Nocardia brasiliensis* seleccionadas.

Preparación de antimicrobianos para ser utilizados en CMI's.

- BTZ 169, fue diluida en caldo Mueller Hinton de una concentración de 0.125 µg a 0.0002 µg/ml.
- BTZ-043, fue diluida en caldo Mueller Hinton de una concentración de 1 µg a 0.001 µg/ml.
- PA-824, fue diluida en caldo Mueller Hinton de una concentración de 64 µg a 0.25 µg/ml.

Preparación de antimicrobianos para ser utilizados en ensayo con macrófagos.

- PBTZ 169, fue diluida en solución salina libre de pirógenos.
- DA-7218 fue diluida en solución salina libre de pirógenos.

Preparación de los antimicrobianos para ser utilizadas en ensayos animales.

- PBTZ 169, fue diluida en hidroxipropilmetilcelulosa al 0.25% y administrada a una dosis de 100 mg/Kg.
- BTZ 043, fue diluida en hidroxipropilmetilcelulosa al 0.25% y administrada a una dosis de 100 mg/Kg.
- TMP/SMX, se utilizó una presentación comercial y fue administrada a una dosis de 100 mg/Kg.

Determinación del efecto de BTZ169 y DA 72 18 sobre macrófagos infectados con *Nocardia brasiliensis*.

- Se preparó una microplaca de cultivo de 24 pozos (BD Falcon Primaria Tissue cultura Multiwell Plates, 24 pozos, becton Dickson, San José California, EUA) con monocapas de macrófagos THP-1, conteniendo aproximadamente 0.4×10^6 macrófagos por pozo. Se descongeló una alícuota con suspensión de *N. brasiliensis* preparada con una concentración determinada previamente y llevada a 1.2×10^6 . Se diluyó esta suspensión dejando una relación 3:1 (*N. brasiliensis*:Macrófagos/ml) Se completó con RPMI 1640 a 1 ml. Se colocó 1 ml de la nueva suspensión ajustada en cada pozo y posteriormente se pasó a microplaca a la incubadora de CO₂ por 3 horas. A las 3 horas se retira de la incubadora y se extrae el sobrenadante posteriormente se colocó 1 ml de medio RPMI diluido con el medicamento a evaluar a diferentes concentraciones del CMI₉₀ de HJEG-1 (.25X, 1X, 4X, 16X), controles positivo y negativo. Se recolocó la microplaca en la incubadora de CO₂ por espacio de 12 hrs. Al pasar el tiempo establecido se retira el sobrenadante y se coloca agua bidestilada fría, se raspa la base de la microplaca y se toma 1 ml de cada pozo y se siembra por triplicado en cajas de petri con agar BHI. Con lo anterior se realizó el conteo de UFC evaluándose así el efecto del medicamento sobre los macrófagos previamente infectados.

Determinación de las concentraciones plasmáticas de PBTZ 169, BTZ 043, TMP/SMX en ratones BALB/c.

- Se determinaron las concentraciones plasmáticas de los antimicrobianos previamente mencionados en ratones hembras BALB/c de entre 8 a 12 semanas para observar los picos plasmáticos y determinar la posología que se utilizó en el modelo experimental terapéutico. Se administraron 100 mg/ml de peso de los antimicrobianos vía oral por sonda orogástrica excepto al grupo del tiempo 0. Se tomaron muestras de sangre (500 µL) del seno retro-orbitario a los a los tiempos 20 min, 40 min, 60 min, 120 min, 240 min y 360 min. se utilizaron un total de 21 ratones para cada antimicrobiano, los que posteriormente se sacrificaron con éter. La sangre obtenida, se centrifugó en micro-centrífuga a 10,000 RPM por 5 minutos, posteriormente se separa el plasma y se congela a -70°C. Al día siguiente se determinaron las concentraciones plasmáticas por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

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

- Se descongela el vial con el plasma tomado de cada ratón. Se toman 50 µl y posteriormente se precipita la proteína con 150 µl de acetonitrilo. La mezcla se agitó en vortex por 1 minuto y posteriormente se centrifugo en micro-centrífuga 5 minutos a 5304 xg. El sobrenadante se filtró en filtros de nylon

de 0.45 µl (Waters). El filtrado se virtió en insertos de 150 µl y se analizaron por HPLC. La separación cromatográfica se consiguió usando un cromatógrafo líquido de HP 1100 con detector de UV. Se utilizó una columna Synergi 4µ Polar-RP 80A de 150 mm x 2 mm con partículas de 4 µm (Phenomex). Las muestras fueron eluidas con fase móvil, la cual consiste en ácido fórmico al 0.1% y agua (Solvente A) y ácido fórmico y acetonitrilo (solvente B); en proporción 60:40. La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 0.2 ml/min. El volumen de inyección fue 5 µl. La detección y cuantificación del fármaco fue radiación ultravioleta a una longitud de onda de 240 nm. La duración máxima fue de 10 minutos.

Ensayos in vivo en ratones BALB/c

- Desarrollo de micetomas 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, la cual fue cultivada en caldo BHI (Brain-Heart-Infusion, BD, Bioxon) a una temperatura de 37° en agitación continua a 110 RPM por 72 hrs. 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 *Nocardia brasiliensis* por 50 µl de solución salina.

- Infección experimental:

Se inocularon 60 ratones hembras BALB/c. Se preparó el inóculo y posteriormente se inocularon 20 mg de peso húmedo de *Nocardia brasiliensis* vía subcutánea en el cojinete de la pata posterior izquierda. Iniciando el ensayo terapéutico cuatro semanas después.

- Ensayos terapéuticos:

Fueron utilizados 4 grupos de 15 ratones cada uno. Se les administraron los fármacos por 10 semanas con descanso de 2 semanas, posterior a la semana seis.

Grupo 1: Se administró PBTZ-11026169 a una dosis de 100 mg/ Kg de peso de ratón dos veces al día, vía orogástrica.

Grupo 2: Se administró BTZ-10526043 a una dosis de 100 mg/ Kg de peso de ratón dos veces al día, vía orogástrica.

Grupo 3: Control negativo. Se administró TMP/SMX a una dosis de 100 mg/ Kg de peso de ratón dos veces al día, vía orogástrica.

Grupo 4: Control positivo. Se administraron 100µl de solución salina dos veces al día, vía orogástrica.

Las lesiones fueron valoradas a las 10 semanas con una escala de 0+ a 4+. En donde 0+ representa sin lesión y 4+ representa lesión severa que se extiende hasta metatarso (36).

VI

RESULTADOS

1. Determinación de la sensibilidad *in vitro* de aislamientos clínicos cepas de *Nocardia brasiliensis* a BTZ 169, BTZ 043 y PA 824 (Concentración Mínima Inhibitoria).

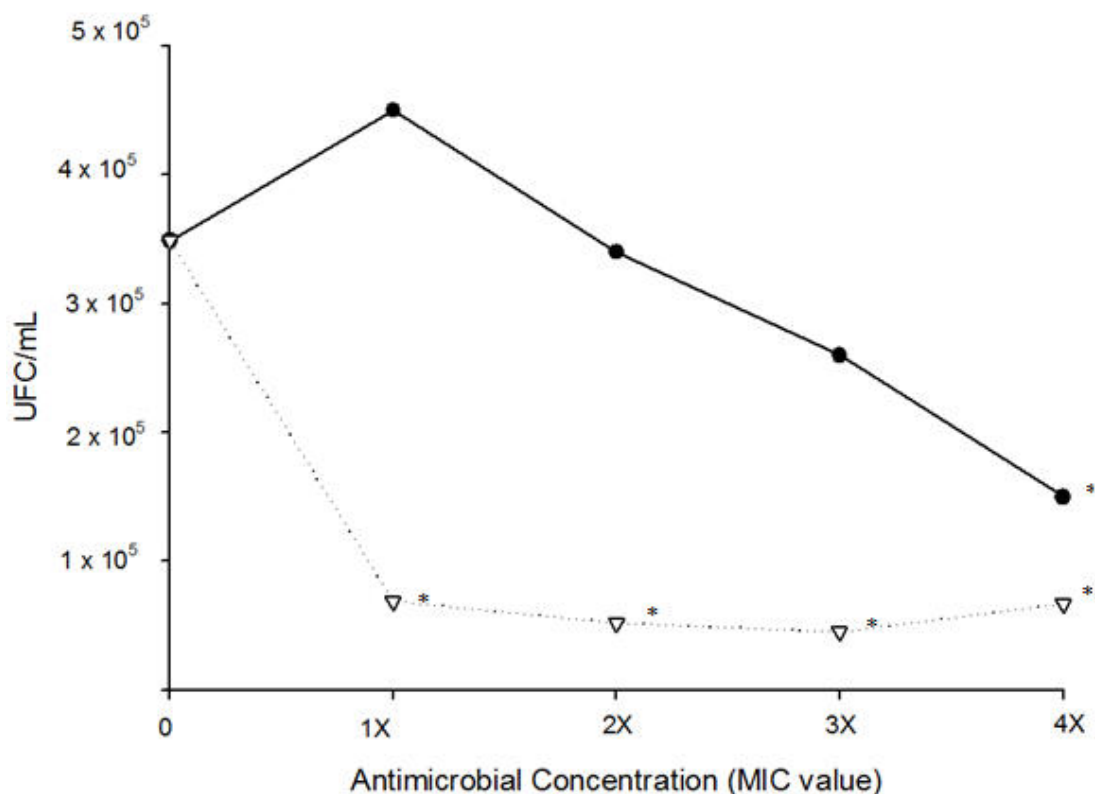
Antimicrobiano	Rango [µg/ml]	CMI 50	CMI 90
BTZ-11026169	0.125-0.0002	0.0075 µg/ml	0.03 µg/ml
BTZ-10526043	1-0.001	0.125 µg/ml	0.25 µg/ml

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria de BTZ-11026169 y BTZ-10526043. Se puede observar como la BTZ-11026169 tiene un CMI menor que la BTZ10526043.

Antimicrobiano	CMI 50	CMI 90
BTZ-10526043	0.125 µg/ml	0.25 µg/ml
PA 824	≥64 µg/ml	≥64 µg/ml

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria de BTZ-10526043 y P-824. Podemos observar como la BTZ-10526043 tiene un valor de CMI menor que el PA-824.

2. Determinación del efecto de PBTZ 169 y DA 7218 sobre macrófagos infectados con *Nocardia brasiliensis*.

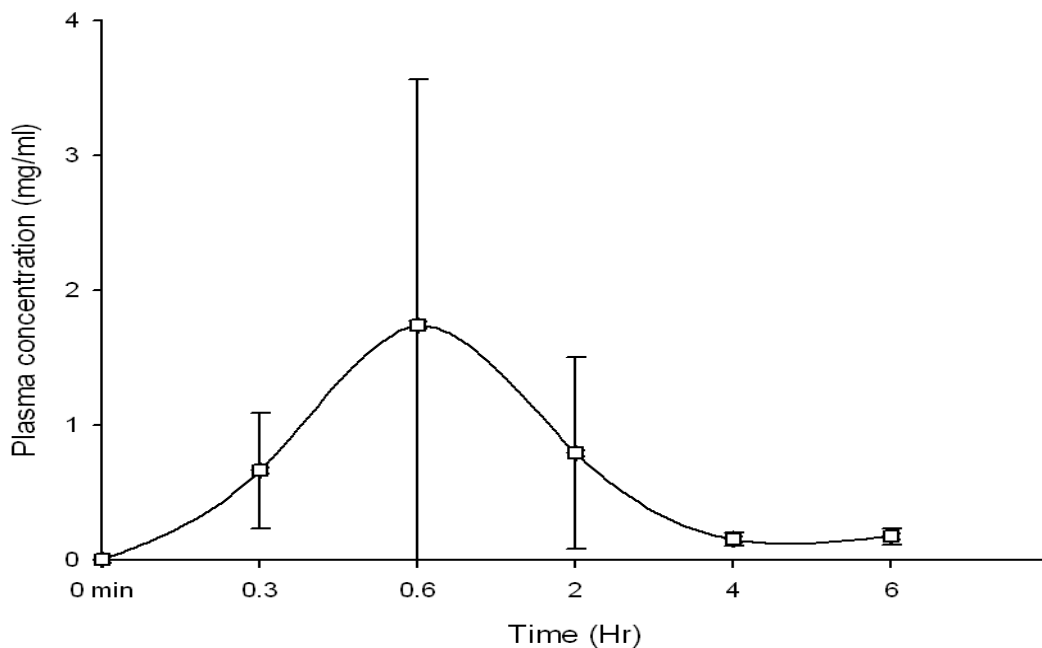


Gráfica 1. Ensayo con macrófagos THP-1. Las UFC de la BTZ-11026169 fueron significativamente menores que el grupo control (DA 7218).

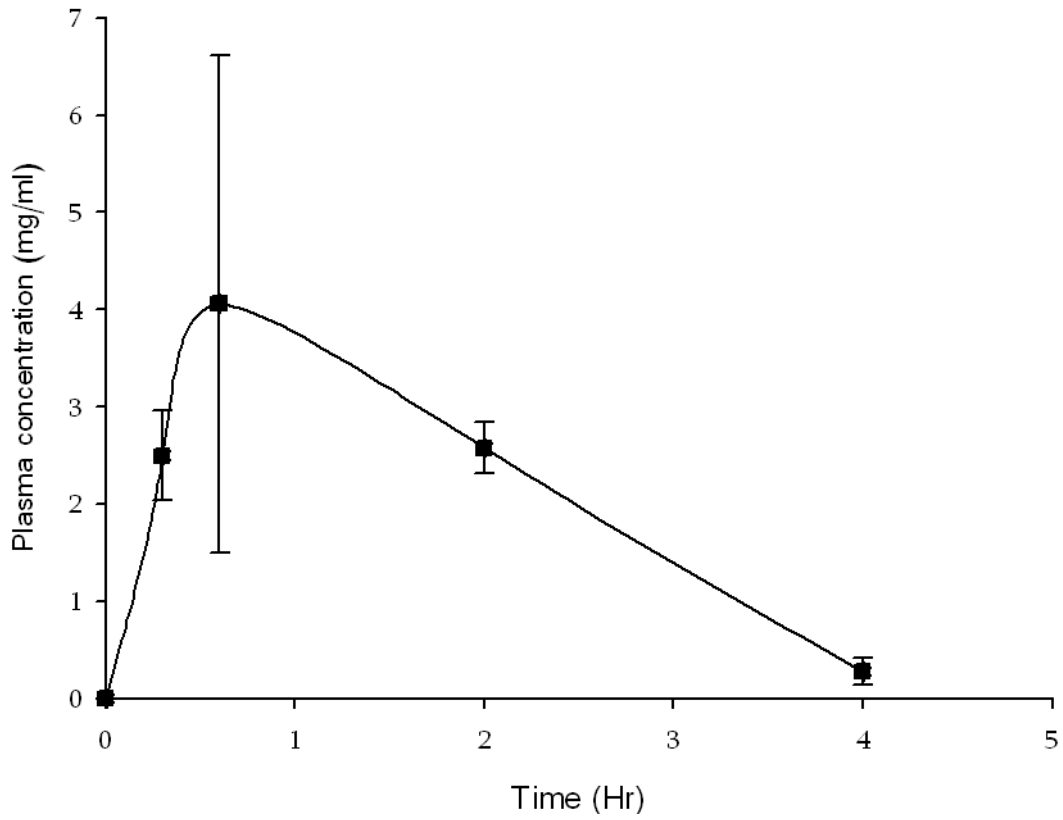
3. Cuantificación de las concentraciones plasmáticas por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución).

Los niveles plasmáticos de BTZ 169 y BTZ0 43 a una dosis de 100 mg/Kg de peso alcanzo su C_{max} a las 4 horas siendo 1.74 y 4.06 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Y su control TMP/SMX alcanzó una C_{max} de 942.94 $\mu\text{g/ml}$ a los 40 minutos,

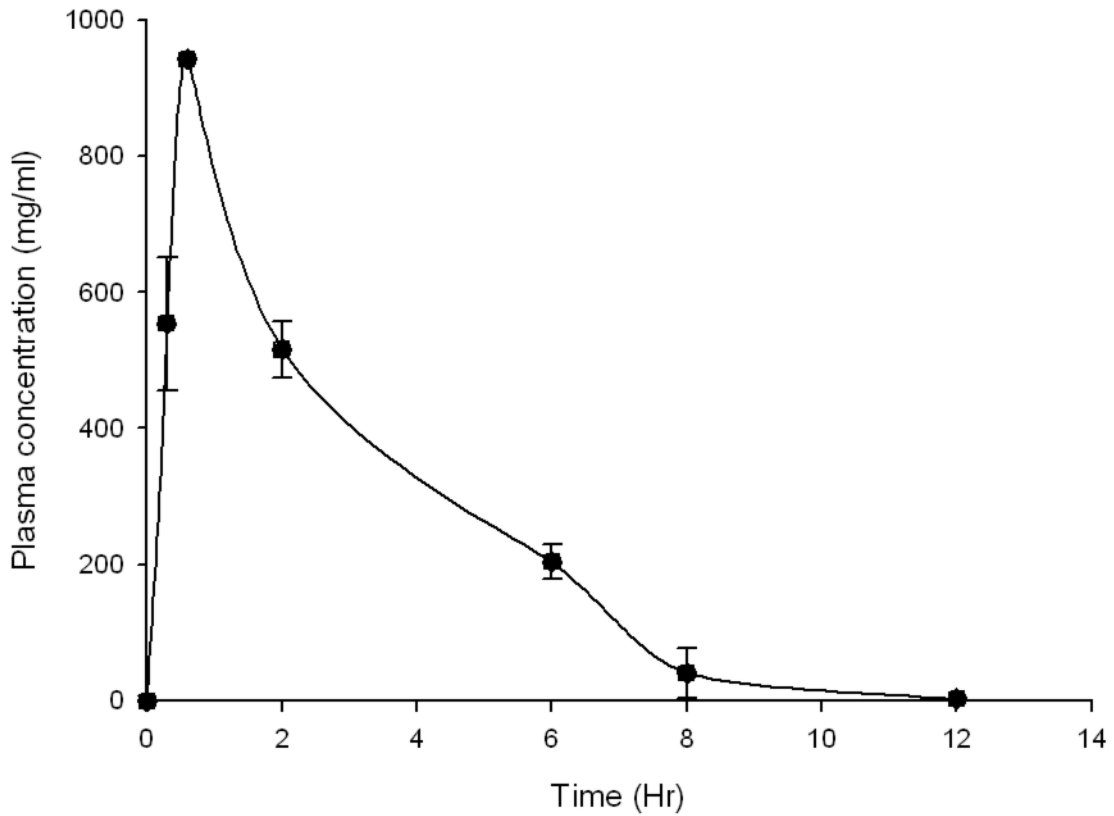
disminuyendo su concentración paulatinamente, siendo casi indetectable a las 12 horas. Las C_{max} se encuentran por arriba del CMI pero no por más de 4 horas.



Gráfica 2. Concentración plasmática de PBTZ 169 en ratones BALB/c. En el minuto 40 se encuentra el pico máximo del medicamento. A las 6 horas ya no es posible detectarla en plasma.



Gráfica 3. Concentración plasmática de BTZ 043 en ratones BALB/c. En el minuto 40 se encuentra el punto máximo del medicamento. A las 6 horas ya no es posible detectarla en sangre.



Gráfica 4. Concentración plasmática de TMP/SMX en ratones BALB/c. Del minuto 20 a las 2 horas se encuentran las mayores concentraciones estando en el minuto 40 el punto máximo del medicamento. A las 12 horas ya no es posible detectarla en plasma.

4. Ensayos in vivo en ratones BALB/c

En este ensayo fue posible observar la diferencia entre los grupos de tratamiento y los controles positivos y negativos al final de las 10 semanas.

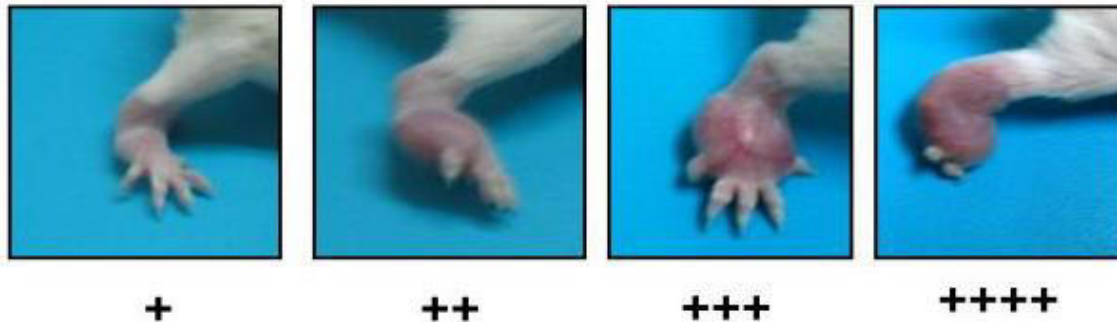
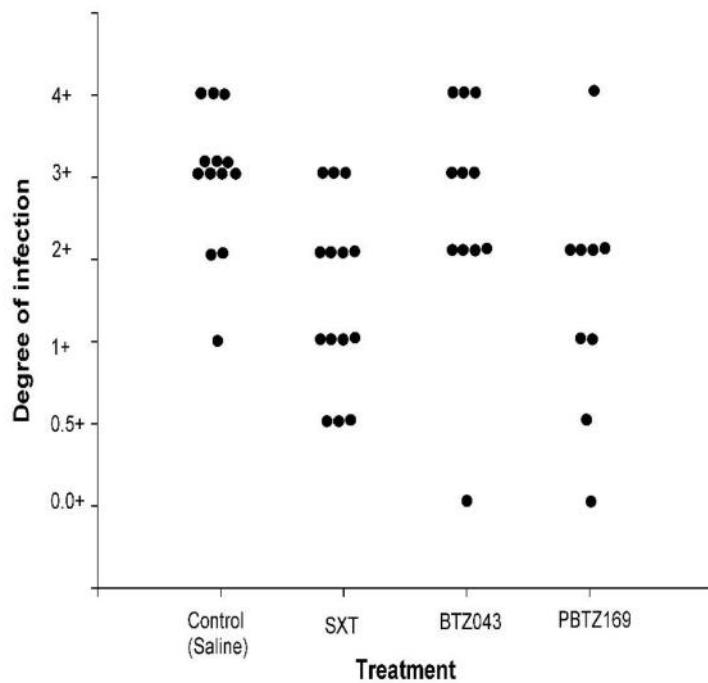


Figura 4. Escala para medición de lesiones producidas por *N. brasiliensis* en el modelo experimental murino. Las lesiones de las patas de los ratones se basaron en el grado de extensión. En una escala de 0 (representa ausencia de lesiones) hasta 4 cruces en el caso de que la inflamación sea severa y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



Gráfica 5. Evaluación al final de las 10 semanas de tratamiento en ratones BALB/c. Cada punto representa la evaluación del cojinete plantar de un ratón.

En este estudio podemos observar que al administrar 100 mg/kg de peso de ratón dos veces al día vía orogástrica hay diferencia significativa entre la BTZ 169 y el control (solución salina) ($P=0.017$); no así entre la BTZ 043 ($P=0.667$)

El grupo tratado con TMP/SMX mostró diferencia significativa comparada con el grupo control ($P=0.007$).



Fig. 5. Grupo control (-): TMP/SMX.



Fig. 6. Grupo de (+): Solución Salina.



Fig. 7. Grupo tratamiento: BTZ 043.



Fig. 8. Grupo tratamiento: BTZ 169.

VII

DISCUSIÓN

En el año 2016 la OMS (Organización Mundial de la Salud) incluyó al micetoma dentro de las enfermedades neglectas. Lo que quiere decir que se considera una enfermedad olvidada o abandonada.

El micetoma es causa de una alta morbilidad y tiene numerosas consecuencias negativas, tanto médicas como sanitarias y socioeconómicas, para los pacientes, las comunidades y los servicios de salud de las zonas afectadas.

El grupo más grande de pacientes está compuesto por campesinos o personas de bajos recursos, que usualmente no buscan ayuda dada la lentitud de la progresión de la enfermedad y su carácter indoloro. Esto, junto con la falta generalizada de educación sanitaria y la escasez de establecimientos de salud en las zonas endémicas propicia que muchos pacientes soliciten atención médica hasta que la infección está ya muy avanzada.

Cuando el paciente ya haya encontrado atención médica adecuada, muy probablemente se encontrará lejos de su casa.

El micetoma no es una enfermedad de declaración obligatoria, y todavía se está desarrollando un sistema mundial de vigilancia. Siguen sin existir programas de control del micetoma, salvo en el Sudán.

Las opciones terapéuticas para el actinomicetoma incluyen el uso de sulfas, como trimetoprim-sulfametoxazol, solo, o en combinación con otro antimicrobiano, generalmente amikacina (esquema Welsh). Este esquema es exitoso en el 95% de los casos, aunque la amikacina tiene efectos secundarios. El linezolid (1200 mg diarios) es una mejor opción dada su menor toxicidad; sin embargo, es de difícil acceso. Con mejores resultados, está el tedizolid (Sivextro, Bayer) (DA-7218), compuesto de tipo oxazolidinona que ha mostrado gran efectividad in vitro e in vivo. La amoxicilina-clavulanato puede ser usada durante el embarazo.

Un grupo de los pacientes que son tratados no responden al tratamiento, y su tratamiento se vuelve múltiple y prolongado.

Por tal motivo el apego al tratamiento es difícil. Una vez que el paciente inicia el tratamiento es posible que presente eventos adversos como nefropatía, hipoacusia, entre otras.

Las Bezotiazinonas (BTZ) fueron sintetizadas con el fin de tratar a pacientes con tuberculosis, y por su relación filogenética hemos decidido investigar su eficacia sobre *Nocardia brasiliensis*.

Dada la actividad nanomolar que tienen las BTZ se esperaba que ambas tuvieran excelente actividad in vitro; solamente la PBTZ169 mostró eficacia terapéutica. *M. tuberculosis* es un microorganismo con una pared más gruesa e hidrofóbica que *N. brasiliensis* y son suficientes 50 mg/kg de BTZ043, una vez al día para mostrar disminución de la cuenta bacteriana en pulmón y bazo. La PBTZ 169 es una droga con mayor acción. En un modelo de infección murino son suficientes 25 mg/kg al día, disminuyendo la cuenta bacteriana aún más. En *N. brasiliensis* usamos concentraciones mayores, (100 mg/kg, dos veces al día) para obtener resultados significativos. Estos resultados se pueden explicar a través de los niveles plasmáticos de los fármacos de los cuales su concentración Cmax fue de 4 µg/ml siendo estos rápidamente metabolizados en un Tmax de 40 min.

La baja actividad de BTZ 169 y BTZ043 pueden deberse a la naturaleza genética de *N. brasiliensis*.

La BTZ169 ha demostrado ser activa in vivo en el modelo murino crónico de TB, siendo su actividad mayor cuando se combina con otras drogas, en particular con bedaquimilina pirazinamida.

La politerapia es esencial en las infecciones de largo tratamiento como la lepra, la tuberculosis y micetoma, la razón principal es para evitar el desarrollo de cepas resistentes. En un futuro cercano será posible realizar nuevos esquemas terapéuticos solos o en combinación en la infección por micetoma.

En aras de aumentar la capacidad en hacer frente al micetoma, el Gobierno del Sudán y la OMS organizaron en Jartum el Primer Taller Internacional de Capacitación sobre el Micetoma; en el año 2019.

Por otro lado, se creó MycetOS (Micetoma de Código Abierto) que es un Proyecto científico destinado a descubrir nuevos medicamentos para el tratamiento del eumicetoma. Hasta ahora no hay un grupo así para el actinomicetoma.

La elaboración de una estrategia de salud pública para prevenir y controlar el micetoma requiere de la recopilación de datos epidemiológicos sobre la carga de la enfermedad, además de inversiones en investigación y desarrollo de productos, de modo que la prevención, el diagnóstico, el tratamiento precoz y la gestión de los casos en entornos con escasos recursos pueda realizarse de manera costo-efectiva.

El micetoma es sin duda una de las enfermedades más olvidadas del mundo. No es bien comprendida ni ampliamente estudiada.

Es por eso, que es nuestra labor como investigadores seguir en la línea de batalla.

VIII

CONCLUSIONES

1. Los CMI's de las BTZ, se encuentra por debajo de lo descrito en la literatura (Amikacina, TMP/SMX, Linezolid, Gatifloxacino, Moxifloxacino). Por tal motivo podría ser una buena opción terapéutica en micetoma actinomicético por *N. brasiliensis*.
2. El modelo de infección de *N. brasiliensis* en macrófagos THP-1 demuestran que la PBTZ 169 tiene acción intracelular sostenida y significativa contra *N.brasiliensis*.
3. La evaluación plasmática de los fármacos en sangre demostró picos por arriba de los CMI's con una *Tmax* en los 40 minutos.
4. El modelo de infección y terapéutico murino demostró diferencia significativa entre los grupos, favoreciendo a la BTZ 169.

IX

BIBLIOGRAFÍA

1. **Arenas, R.** Micología Médica Ilustrada. 3^a Ed. Mc Graw Hill, México. México. 2008.
2. **Andes, D., and Craig, W.A.** Pharmacodynamics of the new fluoroquinolone gatifloxacin in murine thigh and lung infection models. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1665-1670. (2002).
3. **Alangaden, GJ., Lerner, S.A.** The clinical use of fluoroquinolones for the treatment of mycobacterial diseases. *Clin. Infect. Dis.* 25: 1213-1221. (1997).
4. **Andriole, V.T.** The quinolones: prospects. In T Andriole (ed.), *The quinolones*, 2nd ed. Academic Press, Inc. San Diego, Calif. 417-429. (1998).
5. **Ahmed A. D Adelmann, A Fahal, H Verbrugh, A van Belkum, S de Hoog.** Environmental occurrence of *Madurella mycetomatis*, the mayor agent of human eumycetoma in sudan. *J Clin Microbiol* 40 (3): 1031-6 (2002).

6. **Armstrong JA, PD, Hart.** Response of cultures macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fishion of lysosomes with phagosomes. J.Exp Med. 1; 134 (3Pt1)713-740. 1971.

7. **Alvirez-Freites, E., Carter J., and Cynamon, M.H..** *In vitro* and *in vivo* activities of gatifloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 2442-2444. (2003).

8. **Bonifaz, A.** Micología Médica Básica. 2^a Ed. Mendez Editores México. (2000).

9. **Bozdogan, B., Appelbaum, P.C.** Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. Int. J. Antimicrob. Agents. 23: 113-119. (2004).

10. **Bae, S.K., Chung, W.S., Kim, E.J., Rhee, J.K., Kwon, J.W., Kim, W.B., and Lee, M.G.** Pharmacokinetics of DA-7867, a new oxazolidinone, after intravenous or oral administration to rats: intestinal first-pass effect. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 659-662. (2004).

11. **Bath, P.M., Pettingale, K.W., and Wade, J.** Treatment of multiple subcutaneous *Nocardia asteroides* abscesses with ciprofloxacin and dycloxacilin. Postgrad. Med. J. 65: 190-191. (1989).

12. **Brown, B.A.** *In vitro* activities of linezolid against multiple *Nocardia* species. Antimicrob. Agents Chemother. 45(4): 1295-1297. (2001).

13. **Bae, S. K., Yang, S. H., Shin, K.N., Rhee, J.K., Yoo, M., and Lee, M. G.** 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: 955-63. (2007).

14. **Bergan, T.** Pharmacokinetics of the fluoroquinolones. The quinolones, 2nd ed. Academic Press, Inc. San Diego, Ca. 143-182. (1998).

15. **Blondeau, J.M.** Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. Clin. Ther. 1: 3-40. (1999).

16. **Borner, K., H. Lode, G. Höffken, P Koeppel, C. Prinzing, P. Glatzel, R. Wiley, P. Olschewski, B. Sievers, and D. Reinitz.** Pharmacokinetics of ciprofloxacin in healthy volunteers after oral and intravenous administration. Eur J. Clin. Microbiol. 5:179-186. (1986).

17. **Barbachyn, M.R., Ford, C.W.** Oxazolidinone structure-activity relationships leading to linezolid. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42:2010-23. (2003).
18. **Bostic, G.D., Perri, M.B., Thai, L.A., Zervos, M.J.** Comparative *in vitro* and bactericidal activity of oxazolidinone antibiotics against multi drug-resistant enterococci. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 30:109-112. (1998).
19. **Bozdogan B, PC Appelbaum,** Oxazolidinones; activity, mode of action, and mechanism of resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 23 (2); 13-9.
20. **Beaman, B.L., Sugar, A.M.** *Nocardia* in naturally acquired and experimental infection in animals. *J. Hyg. Can.* 1983; 91: 393-419. (1983).
21. **Blondeau, J.M.** Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. *Clin. Ther.* 1: 3-40. (1999).
22. **Cantú, GH.** Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con micetoma en la consulta de Dermatología del HU., periodo enero 1990 – diciembre 2003. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L.

23. **Cavazos-Rocha, N., Vera-Cabrera, L., Welsh-Lozano, O., Waksman-de-Torres, N., and de la Luz Salazar-Cavazos, M.** 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. An.* 43: 1775-1781. (2007).
24. **Creamer, G., Mezence, M.I., Baquero, P., Boiron, M., Huerre, and Houin, R.** Experimental mycetoma due to *Madurella mycetomatis* in non-immunodeficient laboratory mice. *Med. Microbiol. Lett.* 4:76-82. (1995).
25. **Cynamon, M.H.** Activities of several novel oxazolidinones against *M.tuberculosis*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 43:5. (1999).
26. **Chacon-Moreno, B., Welsh, O., Cavazos-Rocha, N., Salazar-Cavazos, M., Garza-Lozano, H., Said-Fernandez, S., Ocampo-Candiani, J., and Vera-Cabrera, L.** Efficacy of ciprofloxacin and moxifloxacin against *Nocardia brasiliensis in vitro* and in experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 295-297. (2009).
27. **Claudia Trefzer.et al.** Benzothiazinones Are Suicide Inhibitors of Mycobacterial Decaprenylphosphoryl- β -D-ribofuranose 2'-Oxidase DprE1. *Journal of the American Chemical Society.* *J. Am. Chem.Soc.* 2012, 134, 912-915.

28. **Claudia Trefzer et al.** Benzothiazinones: Prodrugs That Covalently Modify the Decaprenylphosphoryl-*D*-ribose 2'-epimerase DprE1 of *Mycobacterium Tuberculosis*. J. AM. CHEM. SOC. 2010, 132, 13663–13665 (2010).
29. **Espinoza-González, N.A, Welsh O., de Torres, W.N., Cavazos-Rocha, N., Ocampo-Candiani, J., Said-Fernández, S., Lozano-Garza, G., Choi, S.H., and Vera-Cabrera, L.** Efficacy of DA-7218, a new oxazolidinone prodrug, in the treatment of experimental actinomycetoma produced by *Nocardia brasiliensis*. Molecules. 13: 31-40. (2008).
30. **Espinoza-González NA.** Actividad in vitro e in vivo de una nueva oxazolidinona DA-7175 sobre *Nocardia brasiliensis*.. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León , Monterrey, N.L.2011.
31. **Eun Jeong Y., Yeong W. J., Sung Hak C., Tae H. L., Jae K. R., Moohi Y., Mi Ja S., and Eung Ch. Ch.** *In vitro* and *in vivo* activities of DA-7867, a new oxazolidinone, against aerobic gram-positive bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 49: 2498-2500. (2005).
32. **Fuentes A, R Arenas, M Reyes, RF Fernandez, R Zacarías.** Actinomycetoma and *Nocardia spp.* Report of five cases treated with imipenem or imipenem plus amikacin. Gac Med Mex 142 (3); 247-252.

33. **Fahal AH, M Hassan.** Mycetoma, Br J Surg 1992. 79 (11);1138-41 (1992).
34. **Gómez-Flores, A., Welsh, O.** *In vitro* and *in vivo* activities of antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 832-837. (2004).
35. **González-Ochoa, A.** Producción experimental del micetoma por *Nocardia brasiliensis* en ratón. Gac. Med. Mex. 99:773-781. (1969).
36. **González-Ochoa, A.** Acción de la 4-4-diaminodifenil-sulfona frente a *Nocardia brasiliensis* (estudios *in vitro*, en la infección experimental y en clínica). Gac. Med. 82: 345-53. (1952).
37. **Grasela, D.** Clinical pharmacology of gatifloxacin, a new fluoroquinolone. Clinical Infect. Dis. 31: S51-58. (2000).
38. **Gibson, J.K., Shinabarger, D.L., Aristoff, P.A., Ford, C.W., and Tarpley, W.G.** Oxazolidinones: a new class of antibacterials. Curr. Opin. Pharmacol. 5:470-6. (2001).
39. **López, R.** Micología Médica. México. Trillas. 1ª Edición p. 59. (1995).

40. **López, M.R.** Epidemiology of mycetoma in Mexico: study of 2105 cases. *Gac. Med. Mex.* 128(4):477-81. (1992).
41. **Lavalle P, MC Padilla, J Pérez Gutierrez, I Rivera, S Reynoso Rangel.** Micetomas por *Actinomadura madurae* en México. *Rev Cent Dermatol Pascua.* 9;19-24. 2000.
42. **Macotela-Ruiz, E.** Sur la production de mycétomes expérimentaux par *Nocardia brasiliensis* et *Nocardia asteroides*. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1 : 46-54. (1963).
43. **Murria, J.G., Spooner, E.T., and Walker, J.** Experimental infection of mice with *Madurella mycetomi*. *Trans.R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 54:335-341. (1960).
44. **Moylett, E.H. et al.** Clinical experience with linezolid for the treatment of *Nocardia* infection. *Clin. Infect. Dis.* 36: 313-318. (2003).
45. **Mahgoub, ES.** Mycetomas caused by *curvularia lunata*, *Madurella grisea*, *Aspergillus nidulans*, and *Nocardia brasiliensis* in Sudan *Sabouraudia.* 11 (2); 179-82. (1973).
46. **O. Welsh and L. Vera-Cabrera.** Abstr. 15th Cong. Int. Soc. Hum. Antim. Mycol. Abstr. 354. (2003).

47. **Salinas-Carmona, M.** Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infection and Immunity*. 67: 2428-2432. (1999).
48. **Vera-Cabrera L, J Castro-Garza, A Rendon, J Ocampo-Candiani, O Welsh, SH Choi, K Blackwood, C Molina-Torres.** In vitro susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates to garenoxacin and DA-7867. *Antimicrob Agents Chemother* 40 (10);4351-3.(2005).
49. **Vera-Cabrera L, A Daw-Garza, S said-Fernandez, HG Lozano-Garza NW de Torres, NC Rocha, J Ocampo-Candiani, SH Choi, O Welsh.** Therapeutic effect of a novel oxazolidinone, DA-7867, in BALB/c mice infected with *Nocardia brasiliensis* *PLoS Negl Trop Dis* 10; 2(9);e289.
50. **Vera-Cabrera L, NA Espinoza-González, O Welsh, J Ocampo-Candiani, J Castro-Garza.** Activity of novel oxazolidinones against *Nocardia brasiliensis* growing within THP-1 macrophages. *J Antimicrob Chemother* 64 (5); 1012-1017.
51. **Vera-Cabrera, L., Gómez-Flores, A.** *In vitro* activity of PNU-100766 (linezolid), a new oxazolidinone antimicrobial against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 45: 3629-3630. (2001).

52. **Vera-Cabrera, L., González, E., Choi, S.H., and Welsh, O.** *In vitro* activities of new antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 602-604. (2004).
53. **Vera-Cabrera, L., Ochoa-Félix, E.Y., González, G., Tijerina, R., Choi, S.H., and Welsh, O.** *In vitro* activities of new quinolones and oxazolidinones against *Actinomyces madurae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 1037-1039. (2004).
54. **Vadim Makarov, et al.** Benzothiazinones Kill Mycobacterium tuberculosis by Blocking Arabinan Synthesis. *Science* 324, 801 (2009).
55. **Welsh-Lozano O, MA Rodríguez, MC Salinas-Carmona, L Vera-Cabrera.** Experimental mycetoma by *N.brasiliensis* in rats. *J Mycol Med.* 8; 183-187. 1998.
56. **Welsh O.** Mycetoma. *Semin dermatol.* 12 (4); 290-295. (1993).
57. **Welsh O.** Mycetoma in children. *Mod Probl Paediatr.* 17; 284-253. (1975).
58. **Welsh, O.** Mycetoma. Current concepts in treatment. *Int. J. of Dermatol.* 30:6. (1991).

59. **Welsh, O, Saucedo, E., González, J., and Ocampo J.** Amikacin alone and in combination with trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of actinomycotic mycetoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 17: 443-448. (1987).
60. **Welsh, O., Salinas, M.C.** Mycetoma. *Infectious Diseases.* 5th Edition. 1402 - 1406. (1994).
61. **Welsh, O., Gómez, M., Vera-Cabrera, L.** Advances in the treatment of aerobic actinomycetes infections. (2003).
62. **Welsh O, L Vera-Cabrera, MC Salinas-Carmona.** Mycetoma. *Clin Dermatol* 25 (2); 195-202.
63. **Jesús Alberto Cárdenas-de la Garza.** Clinical characteristics and treatment of actinomycetoma in northeast Mexico: A case series. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* February 25, 2020.

X

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Norma Alejandra González Martínez es originaria de Monterrey N.L., Méx. Es médico con especialidad en dermatología. Sus estudios los realizó en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de N.L. (UANL) y posteriormente en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González de la UANL.

Siempre apasionada en potenciar la salud de la Piel, el Pelo y las Uñas, por medio de la Dermatología Clínica, Estética y Quirúrgica.

Actualmente es la Directora Médica de la Clínica Dermat – dermatología avanzada. Siempre enfocada a Sanar al que lo necesite.