

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
HOSPITAL UNIVERSITARIO “DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ”**

**FACULTAD DE MEDICINA
Servicio de Dermatología**



“Efecto de la inmunización con cepa atenuada más tedizolid en el micetoma experimental por *Nocardia brasiliensis*”

Por

Dr. Luis Angel Yamallel Ortega

**Como requisito parcial para obtener el grado de
ESPECIALIDAD EN DERMATOLOGÍA**

Diciembre 2023

“Efecto de la inmunización con cepa atenuada más tedizolid en el micetoma experimental por Nocardia brasiliensis”

Presentado por:

M.C.P. Luis Angel Yamallel Ortega

Desarrollado en:

Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de Dermatología

Y

Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social

Bajo la Dirección de:

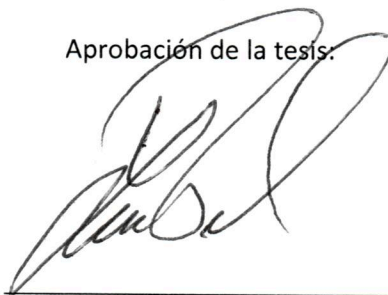
A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Lucio Vera Cabrera', is written over a horizontal line.

Dr. Sc: LUCIO VERA CABRERA

Director de Tesis

“EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN CON CEPA ATENUADA MÁS TEDIZOLID EN EL
MICETOMA EXPERIMENTAL POR NOCARDIA BRASILIENSIS”

Aprobación de la tesis.



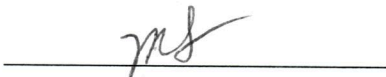
Dr. Sc. LUCIO VERA CABRERA

Director de Tesis



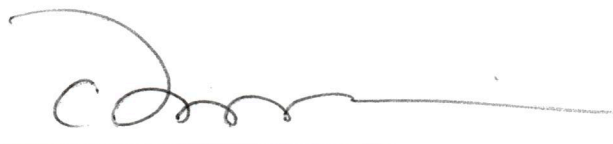
DR. MED. JORGE OCAMPO CANDIANI

Jefe del Servicio de Dermatología



DRA. MED. MINERVA GÓMEZ FLORES

Jefatura de Enseñanza, Servicio de Dermatología



DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres, Dr. Luis Angel Yamallel Saucedo y Dra. Perla Leticia Ortega Loyola, por permitirme llegar a donde estoy ahora. No soy más que lo que ustedes me han dado.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	1
LISTA DE TABLAS.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN	6
1.0 INTRODUCCIÓN	8
1.1 GENERALIDADES.....	8
1.2 HISTORIA	8
1.3 EPIDEMIOLOGÍA	9
1.4 PRESENTACIÓN CLÍNICA.....	10
1.5 ETIOPATOGENIA.....	11
1.6 TERAPÉUTICA	12
1.7 INMUNIDAD	13
2.0 ANTECEDENTES	15
2.1 MICETOMA: MODELO EXPERIMENTAL	15
2.2 ATENUACIÓN BACTERIANA.....	17
3.0 IMPORTANCIA	20
4.0 ORIGINALIDAD.....	21
5.0 JUSTIFICACIÓN.....	22
6.0 HIPÓTESIS	23
6.1 HIPÓTESIS NULA	23
7.0 OBJETIVOS	24
7.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
8.0 MATERIAL Y MÉTODOS	25
8.1 CÁLCULO DE MUESTRA	25
8.2 RECURSOS BIOLÓGICOS	25
8.3 RECURSOS MATERIALES	26
8.4 RECURSOS FINANCIEROS.....	28
8.5 RECURSOS METODOLÓGICOS	28
8.5.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO (P0) DE N. BRASILIENSIS CEPA HUJEG-1.....	28
8.5.2 PREPARACIÓN DE LA VACUNA CON N. BRASILIENSIS CEPA SUBCULTIVADA 200 VECES (P200)	30

8.5.3 TÉCNICA DE VACIADO, DILUCIÓN SERIADA Y EXTENDIDO EN PLACA	31
8.5.5 ADMINISTRACIÓN DE PROFÁRMACO TEDIZOLID.....	32
8.5.6 ENSAYO EXPERIMENTAL EN MODELO MURINO	32
8.5.7 EVALUACIÓN DE CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS	33
8.5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
9.0 RESULTADOS	35
10.0 DISCUSIÓN.....	50
11.0 CONCLUSIONES	53
12.0 REFERENCIAS.....	55
13.0 RESUMEN ANTIBIOGRÁFICO	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Iconografías de la pata inoculada de los ratones del grupo A, representando la semana 1 (columnas A y D), la semana 8 (columnas B y E) y la semana 12, luego de 4 semanas sin tratamiento (columnas C y F). Las celdas con cruces representan pérdidas en la población.

Figura 2. Iconografías de la pata inoculada de los ratones del grupo B, representando la semana 1 (columnas A y D), la semana 8 (columnas B y E) y la semana 12, luego de 4 semanas sin tratamiento (columnas C y F).

Figura 3. Iconografías de la pata inoculada de los ratones del grupo C, representando la semana 1 (columnas A y D), la semana 8 (columnas B y E) y la semana 12, luego de 4 semanas sin tratamiento (columnas C y F). Las celdas con cruces representan pérdidas en la población.

Figura 4. Iconografías de la pata inoculada de los ratones del grupo D, representando la semana 1 (columnas A y D), la semana 8 (columnas B y E) y la semana 12, luego de 4 semanas sin tratamiento (columnas C y F).

Figura 5. Diagrama que representa el largo medido en milímetros de las lesiones producidas a lo largo de 8 semanas de seguimiento en los ratones

Figura 6. Diagrama que representa el ancho medido en milímetros de las lesiones producidas a lo largo de 8 semanas de seguimiento en los ratones.

Figura 7. Diagrama que representa el alto medido en milímetros de las lesiones producidas a lo largo de 8 semanas de seguimiento en los ratones.

Figura 8. Diagrama que representa el volumen aproximado en centímetros cúbicos de las lesiones producidas a lo largo de 8 semanas de seguimiento en los

ratones. Esta medida se obtuvo al multiplicar las tres medidas anteriores siguiendo la fórmula para volumen de un prisma rectangular.

Figura 9. Diagrama que representa la severidad de las lesiones producidas a lo largo de 8 semanas de seguimiento en los ratones.

Figura 10. Hallazgos histopatológicos en un ratón sin tratamiento, luego de 8 semanas.

Figura 11. Hallazgos histopatológicos en un ratón tratado con cepa atenuada NBP200, luego de 8 semanas.

Figura 12. Hallazgos histopatológicos en un ratón tratado con tedizolid, luego de 8 semanas.

Figura 13. Hallazgos histopatológicos en un ratón tratado con NBP200 y tedizolid, luego de 8 semanas.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Dimensiones de la pata trasera derecha de los ratones evaluados, representadas a través del tiempo en cuatro mediciones seriadas. Se presentan los datos del Grupo A (P200 + Tedizolid) y grupo B (P200 en monoterapia).

Tabla 1.2. Dimensiones de la pata trasera derecha de los ratones evaluados, representadas a través del tiempo en cuatro mediciones seriadas. Se presentan los datos del Grupo C (Tedizolid en monoterapia) y grupo D (control con solución salina).

Tabla 2. Dimensiones de la pata trasera derecha de los ratones evaluados, descritas en mediana con desviación estándar. Asimismo, Δ representa la diferencia entre la Semana 8 y la Semana 1 (con valores negativos representando disminución en el tamaño en comparación con el inicial).

Tabla 3. Análisis dicotómico en función del arresto en la progresión de la enfermedad, expresada como Empeoramiento clínico de las lesiones.

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>N. brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>
°C	Centígrados
ATC 700358	Cepa de <i>Nocardia brasiliensis</i> perteneciente a un estudio del Departamento de Inmunología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”
BALB/c	Variedad de ratón albino criado en el laboratorio (<i>Mus musculus</i>)
BHI	Infusión Cerebro-Corazón
DE	Desviación estándar
G	Unidad de fuerza equitativa a la fuerza que ejerce la gravedad sobre un cuerpo en reposo
hrs	Horas
HUJEG-1	Cepa de <i>Nocardia brasiliensis</i> perteneciente al cepario del Laboratorio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”
IgM	Inmunoglobulina M
kg- g – mg	Kilogramos – Gramos – Miligramos
mins	Minutos

mL - µL	Mililitros – Microlitros
mm	Milímetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
P0 / NBP0	Cepa de <i>Nocardia brasiliensis</i> “salvaje”; es decir, que no ha sido subcultivada, y por lo tanto se considera virulenta
P130/NBP130 – P200 / NBP200 – P400 /NBP400	Cepa de <i>Nocardia brasiliensis</i> subcultivada 130 veces, 200 veces y 400 veces respectivamente
r.p.m.	Revoluciones por minuto
TDZ	Tedizolid
UFC	Unidades formadoras de colonias
Δ	Representa la diferencia entre dos medidas en el tiempo.

RESUMEN

Luis Angel Yamallel Ortega

Fecha de Graduación: Marzo, 2024

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: “Efecto de la inmunización con cepa atenuada más tedizolid en el micetoma experimental por *Nocardia brasiliensis*”

Número de páginas: 60

**Candidato para el grado de
Especialidad en Dermatología**

Área de Estudio: Medicina Interna – Dermatología

Propósito y Método del Estudio: Como objetivo, buscamos determinar el efecto de NBP200 en el micetoma experimental establecido en modelo murino, en comparación a farmacoterapia con tedizolid. Utilizando ratones BALB/c, a los cuales se les inoculó con *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1. Después de 12 semanas de evolución, se seleccionaron ratones con lesiones clínicas significativas para formar 4 grupos homogéneos.

- Grupo A: Recibió la combinación de la cepa atenuada P200.
- Grupo B: Recibió solo la cepa atenuada P200.
- Grupo C: Recibió tedizolid.
- Grupo D: Recibió solución salina.

Se midió el cojinete plantar en tres dimensiones en varias semanas y se tomaron iconografías para evaluar las lesiones clínicas. Posteriormente, los grupos se dejaron evolucionar sin tratamiento durante 4 semanas adicionales, y se tomaron fotografías en la semana 12 para evaluar la persistencia de los resultados obtenidos en la semana 8 después de suspender la terapia.

Contribuciones y Conclusiones: Este estudio experimental evaluó NBP200 como tratamiento para modular la respuesta inmunológica en modelos murinos BALB/c con actinomicetoma. Se logró detener la progresión en tamaño y severidad clínica de las lesiones en ratones inoculados con la cepa atenuada NBP200 en comparación con el placebo. A pesar de que el grupo P200 mostró mejoría marcada, esta superioridad no se mantuvo en la semana 6 ni en la medición final de la semana 8.

Es importante destacar que factores clínicos no cuantificables objetivamente, como la intensidad del eritema y turgencia de la piel, sugieren mejoras notables en las intervenciones, especialmente en la combinación de P200 y tedizolid, en comparación con el grupo control.

A pesar de la mejoría durante la intervención, el seguimiento sin tratamiento adicional durante 4 semanas indicó que ninguna intervención pudo mantener la mejoría. Esto sugiere que, aunque son eficaces para detener la progresión de actinomicetomas de severidad moderada a grave, se necesita continuidad en las terapias para mantener estos efectos positivos.

A handwritten signature in black ink, consisting of several large, fluid loops and strokes, positioned above a horizontal line.

Firma del Director de tesis:

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

El micetoma es una infección fúngica subcutánea, recientemente reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad tropical desatendida^{1,2}. El micetoma está representado por la formación de senos nasales de descarga, inflamaciones similares a tumores y la presencia de granos. Conlleva una alta morbilidad y carga socioeconómica cuando no se trata de la forma adecuada.

1.2 HISTORIA

La primera descripción escrita de un caso de micetoma fue en un libro religioso en India, denominado Atharva Veda, en el cual se describía el cuadro de “pie en hormiguero”³. El naturista alemán Engelbert Kaempfer publicó los primeros reportes de micetoma en su obra “*Observationem Exoticarum*”, donde describió los casos de personas afectadas que conoció durante sus viajes en India y Persia⁴. En 1842, un misionario francés llamado John Gill, describió por primera vez casos de tumores en los pies en la región de Madura, en el sur de la India, lo cual llevó a esta infección a ser catalogada como “pie de Madura”³. En 1874, Henry Vandyke Carter utilizó el término “micetoma” por primera ocasión en una publicación sobre “la enfermedad micótica de la India”^{3,5}. Fue hasta 1913 donde se evidenció que la enfermedad estaba causada por dos agentes etiológicos diferentes, por lo cual era posible catalogarla de dos maneras: actinomicetoma (agentes bacterianos) y eumicetoma (agentes micóticos)³. Respecto a sus descripciones en nuestro país, los primeros casos mexicanos fueron descritos en 1874 en la ciudad de Hermosillo, donde se destacó la similitud con los pacientes reportados en la India. Las primeras

descripciones fueron hechas por Cicero en un reporte publicado en 1912, seguido de uno más en 1914 de la autoría de Ocaranza⁶⁻⁹.

1.3 EPIDEMIOLOGÍA

Los reportes existentes establecen una distribución geográfica característica, entre las latitudes 15°S y 30°N, la cual ha sido denominada como el “cinturón del micetoma”¹⁰. Las áreas endémicas incluyen Sudán, Somalia, Senegal, India, Yemen, México y Venezuela^{11,12}. No obstante, la verdadera área endémica llega más allá del mismo. La mayoría de los casos ocurren en lugares de clima cálido y árido, donde existe un período corto de lluvias intensas. El actinomicetoma es más prevalente en áreas más secas en comparación con el eumicetoma, que se presenta en sitios con más pluviosidad¹⁰. Las áreas endémicas suelen tener vegetación similar a la de la sabana, donde los árboles de acacia con espinas son relativamente comunes¹³.

Los datos respecto a la incidencia y a la prevalencia del micetoma están pobremente documentados: actualmente, es considerada por la OMS como una enfermedad tropical desatendida¹. En la mayoría de sus regiones endémicas, no existe una adecuada estrategia de vigilancia, notificación y reporte. La mayoría de los casos reportados se limitan a casos anecdóticos y hallazgos de primer contacto. Una revisión sistemática realizada en 2013 por Van de Sande y colaboradores¹⁴ estimó que los casos de micetoma publicados hasta la fecha eran 8,763. La mayoría de los casos reportados al momento de la redacción fueron mexicanos, representando 2,607 de los mencionados. En esta revisión, los países con mayor prevalencia reportada eran Mauritania y Sudán; no obstante, después de estos, los países con mayor prevalencia reportada incluían México, Senegal, Nigeria y Somalia.

Respecto a los datos recopilados en nuestro país, existen dos grandes estudios frecuentemente referenciados: el primero, realizado en 2013 por López-Martínez y colaboradores, en el cual se presenta una serie de 3933 casos de micetoma¹⁵; y otro redactado por Bonifaz y su equipo en el año 2014, relatando su experiencia con 482 casos en el Hospital General de México¹². Estos dos estudios fueron de especial utilidad para describir la epidemiología del micetoma en nuestro país. En 24 de los estados de la república se han reportado casos de micetoma, pero los que presentan una mayor prevalencia incluyen a Jalisco, Morelos, Nuevo León, Guerrero y Veracruz¹⁵.

El micetoma afecta todos los grupos de edad, pero es en definitiva más común en varones jóvenes entre los 20 y 40 años de edad¹⁰, quienes en áreas endémicas y en ámbitos socioeconómicos de bajo y medio nivel, corresponden generalmente al grupo con mayor actividad ocupacional. Ninguna ocupación está exenta, pero los ganaderos y agricultores son el grupo con mayor afectación^{10,12,16}. La predominancia en el varón está bien descrita, con una proporción de 1.6-6.6:1 tanto en adultos como en niños; diferencia que nuevamente puede verse explicada por la actividad ocupacional¹⁰.

1.4 PRESENTACIÓN CLÍNICA

El micetoma es una enfermedad crónica, representada por la formación de senos con descarga purulenta, lesiones exofíticas similares a tumores y la característica presencia de granos, colonias compactas del agente etiológico. El micetoma conlleva una alta morbilidad y carga socioeconómica cuando no se trata de la forma adecuada. El agente causal se introduce a través de un pequeño trauma en la piel; después de lo cual forma colonias compactas llamadas granos. Clínicamente, comienza como un pequeño nódulo que crece hasta convertirse en

una masa subcutánea con senos y fístulas, los cuales secretarán exudado serosanguinolento, viscoso y/o purulento, con la presencia de granos dentro del mismo. Si no recibe tratamiento, la infección se propaga a través de la fascia y el músculo subyacentes e involucra gradualmente el hueso. El dolor generalmente no está presente^{10,11,14,17}.

N. brasiliensis afecta principalmente a las extremidades inferiores; sin embargo, se han reportado otras regiones como manos, pies, espalda y esternón¹⁶. También se pueden encontrar localizaciones menos frecuentes en la literatura, como pleura, órbita, pericardio, pulmones y mediastino¹⁸⁻²².

1.5 ETIOPATOGENIA

El micetoma puede ser causado por hongos filamentosos (eumicetoma) o por un filo de bacterias grampositivas aerobias (actinomicetoma). Algunos de estos microorganismos han sido encontrados en la tierra, así como en el tracto digestivo de gusanos, y en materia vegetal¹⁰. Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los casos son causados por actinomicetos. Con base en una serie de casos y meta-análisis reciente¹⁴, las especies *Actinomadura madurae*, *Streptomyces somaliensis*, *Actinomadura pelletieri*, *Nocardia brasiliensis* y *Nocardia asteroides* corresponden a los agentes causales más comunes. En las series de caso más extensas realizadas en nuestro país, se reportó que los agentes etiológicos más comunes correspondían a la familia de los actinomicetos, correspondiendo a un 98% de todos los casos. De ellos, el más frecuente fue *Nocardia brasiliensis*, el cual se encuentra presente en el 86% de dichas infecciones^{12,15}. Por otra parte, un estudio recientemente realizado en nuestro centro demostró que los datos epidemiológicos eran consistentes con aquellos reportados

por otras fuentes mexicanas, donde en 31 pacientes el patógeno reportado en mayor frecuencia fue *N. brasiliensis*¹⁶.

Nocardia brasiliensis es un bacilo aerobio, Gram positivo, filamentosos, parcialmente alcohol-resistente, que habita en el suelo y la materia vegetal. Su ruta de entrada en el organismo del huésped es a través de la inoculación traumática; generalmente, con espinas o astillas de madera. En algunos casos, sin embargo, no hay antecedentes de trauma^{10,11,23}.

El diagnóstico generalmente se logra a través de la identificación del agente causal mediante técnicas de microscopía directa²⁴⁻²⁶. Otras técnicas de laboratorio incluyen citología, histopatología²⁷, serología y técnicas moleculares²⁸.

1.6 TERAPÉUTICA

Además del entusiasmo mostrado por los países endémicos, la investigación en micetoma es carente en el resto del mundo. Un grupo limitado de dermatólogos, micólogos y cirujanos interesados en la micología tropical fueron los primeros en llevar a cabo estas investigaciones. Los trabajos de Gonzales-Ochoa y Latapi y Lavallo fueron los primeros en dilucidar la sensibilidad in vitro y se hicieron las primeras recomendaciones respecto al tratamiento con las sulfonas^{6,29,30}.

Poco después de esto, se utilizaron otros fármacos como rifampicina, isoniazida, estreptomina y minociclina con tasas de curación variables^{17,23}. A finales de la década de 1960, la combinación de sulfametoxazol y trimetoprima se convirtió en el estándar de oro del tratamiento. En 1982, se utilizó una combinación de amikacina y sulfametoxazol en un paciente joven diagnosticado con un micetoma de la pared torácica diseminado a los pulmones. Se observó una mejoría rápida, sin recurrencias hasta la fecha de publicación. Este régimen de tratamiento fue posteriormente conocido como el "régimen Welsh", y su efectividad fue reconocida

posteriormente por diferentes autores^{23,31-33}. Mucho más tarde, Damle et al (2008) publicaron el "Régimen Welsh Modificado" que incluía la combinación de amikacina, sulfametoxazol y rifampicina, para el tratamiento del micetoma actinomicótico³⁴. Desde entonces, se han ensayado otras estrategias y combinaciones in vitro e in vivo para el tratamiento del actinomicetoma: algunos de los agentes farmacológicos utilizados incluyen otros aminoglucósidos distintos a la amikacina, así como amoxicilina-clavulanato, minociclina, moxifloxacino, linezolid y carbapenémicos^{23,33,35}. El tratamiento quirúrgico está indicado para lesiones pequeñas y localizadas, y también en lesiones grandes para reducir la carga del microorganismo³⁶.

1.7 INMUNIDAD

En el micetoma, la respuesta inmune innata es la que está principalmente involucrada, en particular la respuesta de tipo celular-T. *N. brasiliensis* posee la capacidad de eludir a la respuesta de las células fagocíticas. Algunos datos sugieren que proteínas solubles del patógeno es capaz de inducir protección en modelos animales, induciendo una respuesta celular de tipo T³⁷. La respuesta tipo Th1 está presente en la fase aguda de la enfermedad, así como en los controles endémicos sanos. Por otra parte, la respuesta Th2 es más característica de las lesiones primarias y los ganglios linfáticos adyacentes a la infección, particularmente la respuesta mediada por interleucina 10 e interleucina 4¹⁰.

La respuesta humoral también cobra un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Un estudio experimental realizado por Salinas-Carmona en 2004 demostró que en un modelo murino inmunocompetente, los anticuerpos IgM lograron inducir protección específica contra un actinomicetoma experimental por

*Nocardia brasiliensis*³⁸. Este efecto inmunomodulador parece estar limitado a la IgM, no así a la inmunoglobulina de tipo G³⁸.

El rol de la inmunidad y tratamientos inmunomoduladores en la terapéutica del micetoma no está bien esclarecido y continúa en estudio¹⁰.

2.0 ANTECEDENTES

2.1 MICETOMA: MODELO EXPERIMENTAL

El uso de modelos animales para el estudio de la anatomía y la fisiología se remontan a publicaciones anteriores a la era común³⁹. Durante la época del Renacimiento, el médico y autor William Harvey tenía especial cuidado en aprovechar propiedades intrínsecas de la fisiología y anatomía del animal, como su ritmo cardíaco³⁹. La selección apropiada de una especie en particular para el estudio de una entidad específica es un punto desafiante para el investigador, puesto que deben tomarse en consideración los estudios previamente publicados, la factibilidad económica y administrativa, así como las características biológicas inusuales del animal. Uno de los mejores ejemplos en la investigación médica es el armadillo de nueve bandas para el estudio de *M. leprae*⁴⁰⁻⁴³.

En el micetoma, el uso de modelos animales para la inducción de la enfermedad, la descripción de su evolución natural, y la evaluación de diferentes opciones terapéuticas, es una práctica que nos antecede por varias décadas⁴⁴⁻⁴⁹. Aunque existen antecedentes e investigaciones en curso en otras especies, como lo son mono y larvas de polilla⁵⁰⁻⁵², el modelo mayormente reproducido es el modelo en ratones; y en lo que concierne el caso particular del actinomicetoma causado por *Nocardia brasiliensis*, el uso de ratones de laboratorio BALB/c es la práctica con mayor grado de reproducibilidad en la actualidad⁵³⁻⁵⁹.

Los primeros modelos animales de micetoma experimental descritos en la literatura latinoamericana se recopilan en el trabajo realizado por González-Ochoa en 1969⁶⁰, donde además de realizar la mencionada recopilación, su equipo de trabajo describió un método mediante el cual se logró inocular *N. brasiliensis* en la almohadilla plantar de un ratón BALB/c. Esto produjo “prácticamente en todos los

animales una tumoración fistulosa crónica con presencia de granos[...]; es decir, un típico micetoma en todo semejante al humano”. Además, otros hallazgos de utilidad incluyeron la detallada descripción de que en una población finita de ratones inoculados en la almohadilla plantar, la mitad de los animales mostraron inflamación traumática, la cual desapareció después de 8 días en el 30% de los animales y se mantuvo en forma mínima en el resto. Para la semana 3, la inflamación comenzó a acentuarse y en aquellos animales que habían sido negativos, la tumoración comenzó a formarse. Luego de un mes, el 50% de los animales mostraba la lesión continuando su desarrollo en los animales positivos y principiando a formarse en aquellos negativos. A la sexta semana, el número de animales positivos ascendió a 80%; aumentando este porcentaje con el transcurso del tiempo de manera que para los 6 meses prácticamente el 100% de los animales mostraron la enfermedad. Para esa época el 25% de los animales presentaban micetoma de +++ (tres cruces); el 20%, una inflamación de ++ (dos cruces); el 35% de + (una cruz) y en el 20% restante sólo se observó una inflamación mínima (+/-).

Diseños anteriormente descritos en nuestra institución han utilizado modelos murinos para el desarrollo de micetoma de forma exitosa: uno de los estudios realizados por Salinas-Carmona y colaboradores ilustró la evolución clínica y la respuesta inmune a antígenos inmunodominantes purificados a partir de *N. brasiliensis*, el cual fue realizado en un modelo animal. En este estudio se utilizaron ratones macho y hembra BALB/c de 9 a 12 semanas de edad, a los cuales se les administró un inóculo aislado de *N. brasiliensis* cepa ATCC 700358^{61,62}. Asimismo, un trabajo realizado por el equipo de Almaguer-Chávez en 2011 describió las diferencias clínicas entre un actinomicetoma experimental inducido por una cepa

salvaje y un actinomicetoma experimental inducido por una cepa sub-cultivada, donde esta última produjo lesiones clínicas de menor intensidad⁶³.

Un estudio realizado por González-Carrillo y colaboradores en 2016, estudió la pérdida de virulencia en NBP200 y cómo su aplicación en un modelo murino dotaba de resistencia ante la producción de un micetoma por la cepa parental (NBP0). Es decir, se realizaron inóculos en el cojinete plantar de 20 ratones, utilizando una cepa de *N. brasiliensis* subcultivada 200 ocasiones. Luego de 12 semanas, el cojinete plantar contralateral fue inoculado con NBP0. A las 15 semanas, ningún ratón salvo uno presentaba lesiones. El análisis histológico demostró la presencia de un infiltrado mononuclear en las lesiones, así como la presencia de múltiples granos en diferentes etapas de destrucción.⁶⁴

Este trabajo sirvió de antecedente para el estudio de García-Lozano en 2019, cuyo equipo de investigadores comparte miembros con el equipo actual: en él se evaluó la respuesta inmune producida por la aplicación de una cepa atenuada de *N. brasiliensis* en un modelo murino con un actinomicetoma previamente establecido. Este trabajo demostró resultados alentadores, estableciendo la posibilidad de una alternativa terapéutica⁶⁵. Es con base en estos hallazgos que se desarrolló la hipótesis presentada en este escrito.

2.2 ATENUACIÓN BACTERIANA

Las células cultivadas in vitro, con el paso del tiempo, agotaran los nutrientes que el medio les provee, además de liberar metabolitos tóxicos al mismo y crecer en número. Cuando una población celular en un cultivo artificial ha ocupado un porcentaje importante del medio (en cultivos animales, por ejemplo, se acepta cerca del 80%), las células deben ser transferidas a un nuevo medio para continuar su crecimiento de forma apropiada⁶⁶. Este proceso es denominado “pase”, y tras

realizar un pase, se genera un nuevo “subcultivo”. Es importante registrar el número de subcultivo, debido a que pueden ocurrir variaciones; las bacterias tienen la facultad de adaptarse al medio, por lo cual no es infrecuente hallar alteraciones en su biología, como una disminución de sus factores de virulencia.

Los subcultivos, por su propiedad de disminuir la virulencia, son utilizados como una forma sencilla de producir patógenos bacterianos atenuados. Éstos desencadenan una intensa respuesta inmune, sin causar infección, y por lo tanto poseen un rol importante en el desarrollo vacunas. Un excelente ejemplo es el bacilo de Calmette-Guérin, una forma atenuada de *Mycobacterium bovis*, que actualmente es utilizada para prevenir formas severas de tuberculosis⁶⁷. Aplicaciones más recientes incluyen las vacunas orales para la fiebre tifoidea y para el cólera^{68,69}.

En el 2011 un estudio realizado por Almaguer-Chavez y colaboradores⁶³, describió que luego de realizar subcultivos continuos de *N. brasiliensis*, se observó una disminución en su capacidad virulenta. La inoculación de una cepa P130 (es decir, subcultivada 130 ocasiones en una infusión de cerebro-corazón durante cuatro años) en un modelo murino BALB/c no producía lesiones de actinomicetoma al paso de 12 semanas. Adicionalmente, estos ratones fueron subsecuentemente inoculados con una cepa P0 no-subcultivada para valorar su resistencia a la infección. Luego de cinco semanas, las lesiones comenzaron a sanar, revelando la capacidad de la cepa no-virulenta de *N. brasiliensis* de inducir una resistencia parcial a la infección por el microorganismo virulento.

En el 2019, el equipo de García-Lozano⁶⁵, también utilizó un modelo murino para identificar la efectividad de una cepa subcultivada de *N. brasiliensis* como un inductor de la respuesta inmune en ratones previamente infectados con una cepa virulenta no-subcultivada. Luego de 12 semanas, reportaron que el proceso de

inoculación con P200 (es decir, subcultivada 200 ocasiones) logró modificar el curso natural de la enfermedad, disminuyendo el tamaño de las lesiones en comparación con el grupo control.

Estos estudios previos establecen que subcultivar de forma continua *N. brasiliensis* y utilizar este inóculo a manera de “vacuna”, resulta tanto en la pérdida de virulencia del patógeno, así como el desarrollo de una resistencia parcial en el huésped. Con base en estos resultados, se considera de esencial importancia determinar si la activación del sistema inmune inducida por una vacuna puede cambiar el curso natural de la enfermedad de la misma forma que otros tratamientos. Si este razonamiento es correcto, la adición de esta terapia a otros esquemas previamente establecidos podría ser ventajoso en casos resistentes a tratamiento convencional.

3.0 IMPORTANCIA

La importancia de este estudio radica en evaluar si la aplicación de inóculos con cepas atenuadas de *N. brasiliensis* P200 (es decir, subcultivadas 200 ocasiones) produce una activación del sistema inmune y cambia el curso natural de la enfermedad de forma benéfica. Eso supondría una nueva opción terapéutica para pacientes con casos refractarios, o en aquellos casos donde el apego a los esquemas convencionales sea difícil.

4.0 ORIGINALIDAD

Estudios previos han señalado que los cultivos subsecuentes de *N. brasiliensis* inducen una pérdida en su capacidad de virulencia. Asimismo, la aplicación de cepas atenuadas P200 y P400 en un modelo murino fue recientemente descrito en un estudio realizado en nuestro centro. Hasta la fecha, no se ha comparado esta novedosa terapia con un régimen farmacológico establecido.

5.0 JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento, el uso de esta vacuna no ha sido valorado de forma comparativa contra antibioticoterapia eficaz contra el patógeno, ni tampoco de forma simultánea con la misma. Consideramos que este modelo experimental de una vacuna contra la infección contra *N. brasiliensis* podría ser considerada como una posibilidad no-inferior o adyuvante a la farmacoterapia ya conocida.

6.0 HIPÓTESIS

En un modelo murino BALB/c, el uso de una cepa subcultivada de P200 *N. brasiliensis* (NBP200) logrará cambiar de forma benéfica el curso natural de la enfermedad, y será no-inferior al uso de Tedizolid para esta entidad.

6.1 HIPÓTESIS NULA

En un modelo murino BALB/c, el uso de una cepa subcultivada de P200 *N. brasiliensis* (NBP200) no logrará cambiar de forma benéfica el curso natural de la enfermedad, y no será comparable al efecto del Tedizolid en esta entidad.

7.0 OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de NBP200 en el micetoma experimental establecido en modelo murino, en comparación a farmacoterapia con tedizolid.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A.** Determinar si la aplicación de NBP200 disminuye las lesiones de micetoma experimental establecido; tanto en monoterapia como en combinación con tedizolid.

- B.** Determinar cambios histopatológicos locales durante la administración de NBP200.

8.0 MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 CÁLCULO DE MUESTRA

Los datos que se utilizaron para el cálculo de muestra fueron extraídos del estudio previamente realizado por García-Lozano⁶⁵ y colaboradores en 2022, donde se realizó un análisis de 2 grupos con intervención y un grupo control, con una 'n' de 20 sujetos en cada grupo. El número de animales a utilizar en este trabajo se calculó mediante el método de análisis de poder, con estimación de media en 2 poblaciones, definiendo un intervalo de confianza de 95% y un poder de 80%, para una evaluación de 4 grupos en total. De esta manera, se concluyó que el número ideal es de 17 sujetos.

Asimismo, asumiendo una tasa de desgaste (defunción natural) del 5%, se arribó a un cálculo de muestra corregida de 18 sujetos por grupo. Por otro lado, es importante destacar que en nuestro estudio se utilizarán solamente ratones que hayan desarrollado un micetoma mayor o igual a ++ (dos cruces). Según el estudio realizado por González-Ochoa⁶⁰, en una población finita de ratones inoculados en la almohadilla plantar, a los 6 meses el 45% de los ratones presentarán una inflamación de ++ (dos cruces) o +++ (tres cruces). Esperando una respuesta similar en nuestro estudio, para obtener un total de 72 sujetos repartidos entre cuatro grupos, necesitarían inocularse de forma inicial 160 ratones.

8.2 RECURSOS BIOLÓGICOS

- a. Ciento sesenta (160) ratones BALB/c hembras de entre 8-12 semanas de edad para la inoculación de cepa P0 (cepa salvaje) obtenidos a través de proveedor Animals Ideas y Servicios Agropecuarios, SA de CV; donde el Centro de Investigación

Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, se encargará del cuidado de los mismos.

- b. Cepa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 salvaje (NBP0) obtenida de la colección del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de Dermatología.
- c. Cepa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 subcultivada 200 veces (NBP200) obtenida de la colección del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de Dermatología.

8.3 RECURSOS MATERIALES

Se utilizarán las instalaciones del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de Dermatología y el Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social.

A continuación se detallan los recursos materiales utilizados:

- a. Aparatos:
 - Biological Safety Cabinet Nuaire Model Nu 425400
 - Agitador continuo: C24, Classic 24 Incubator Shaker M1247-0004, New Brunswick Scientific
 - Thermo Scientific ELED 3759 Thermo 818 Precision
 - SterileMax Steam Sterilizer From Thermo Scientific
 - Yamato Scientific SE-510 Steam Sterilizer
 - Heathrow Scientific LLC RF3000
 - Ultra low Freezer Nuaire NU-6580G

- Vernier calibrado en milímetros
- Labnet - VX-100 – LabWrench
- Sartorius PT150 (150g/.01g) No. 610036014
- Pipeta automática
- Pipetman (Gilson) 200 - 1000µL E653774
- Pipet lite (Rainin) 20-200µL F0631633A
- Centrífuga ThermoFisher Scientific SL 16R

b. Consumibles:

- Agar Infusión Cerebro-Corazón (BHI) BD Bioxon Ref. 214700
- Infusión Cerebro-Corazón BD Bioxon Ref. 211200
- Placas Petri de plástico de 100x15mm BD Bioxon
- Matraces: Pyrex 25mL; Pyrex 2000mL
- Pipetas lineales: 5mL 5 x 1/10 Pyrex; 5mL 5 x 1/10 Kimax; 5mL 5 x 1/10 Brand
- Puntillas desechables para pipeta automática:
 - Corning Incorporated: 1-200 uL (amarillas)
 - Biologix: 20-1000 uL (azules)
- Asa de siembra en forma de L de poliestireno azul Fisher Scientific
- Agua inyectable libre de pirógenos PISA frasco con 500 ml

- Solución salina libre de pirógenos CS PISA, cloruro de sodio inyectable al 0.9%.
- Agua destilada Laboratorios Monterrey S.A. de C.V.
- Tubos cónicos para centrifuga Falcon™ Biologix
 - 15 mL
 - 50 mL
- Jeringas desechables estériles 1mL c/aguja de 21G x 32mm
- Guantes de látex Ambiderm Confort
- Homogeneizador Potter de 40 mL Pyrex

8.4 RECURSOS FINANCIEROS

El proyecto de tesis se realizará con recursos propios del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José E. González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

8.5 RECURSOS METODOLÓGICOS

Estudio experimental in vivo prospectivo, comparativo y longitudinal. Se inocularán 160 ratones hembra BALB/c de 8-12 semanas de edad en el cojinete plantar izquierdo NBP0. Luego de 12 semanas, se administrará NBP200 como intervención, en monoterapia y en combinación con tedizolid.

8.5.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO (P0) DE N. BRASILIENSIS CEPA HUJEG-1

El proceso de siembra en caldo de cultivo y obtención de masa celular para la realización del inóculo NBP0:

Se obtendrá la cepa salvaje NBP0 HUJEG-1 (ATCC #700358) del congelador del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de Dermatología y se descongelará a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, se sembrará en placas de agar sangre con técnica en 3 estrías, la cual se incubará a 37°C durante 72 hrs. Acto seguido, se tomarán las colonias de *N. brasiliensis* y se colocarán en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 25 mL de caldo de cultivo Infusión Cerebro-Corazón (BHI). Se incubarán en agitación constante a 110 r.p.m. a 37°C durante 72 horas. Las colonias obtenidas se decantarán en tubos cónicos de 50mL (Falcon).

El proceso de obtención de suspensión unicelular se realizará de la siguiente manera: se centrifugarán los tubos a 3,500 r.p.m durante 10 minutos. Se removerá el excedente sobrenadante y se agregarán 20mL de agua destilada para el “lavado” de las células. Los pasos de centrifugación y lavado de las células se repetirán a estas mismas especificaciones en otras dos ocasiones.

Posteriormente, se retirará el excedente y las colonias obtenidas serán maceradas en un homogeneizador de cristal (Potter) durante 1min. Al resultado se le denomina suspensión bacteriana unicelular.

La ya mencionada es utilizada para inocular matraces Erlenmeyer de 2,000 mL con 400 mL de caldo de cultivo BHI, los cuales se incubarán a agitación constante a 110 r.p.m. a 37°C durante 72 horas.

A la masa obtenida, nuevamente se le realiza el proceso previamente descrito hasta obtener nuevamente una suspensión bacteriana unicelular. Este será centrifugado a 100G durante 10 minutos para remover el medio excedente. Al botón resultante se le centrifugará de nueva cuenta a 3,500 r.p.m. durante dos ciclos de 10 minutos, removiendo el excedente entre cada ciclo.

Finalmente, se preparará esta masa en solución salina al 0.9% hasta obtener una concentración de 20mg/50µL.

8.5.2 PREPARACIÓN DE LA VACUNA CON *N. BRASILIENSIS* CEPA SUBCULTIVADA 200 VECES (P200)

El proceso de siembra en caldo de cultivo y obtención de masa celular para la realización de la vacuna P200 se realizará de la siguiente manera:

El subcultivo NBP200 HUJEG-1 se obtendrá del congelador del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de Dermatología y se descongelará a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, se sembrará en placas de agar sangre con técnica en 3 estrías, la cual se incubará a 37°C durante 72 hrs. Posteriormente, se tomarán las colonias de *N. brasiliensis* y se colocarán en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 25 mL de caldo de cultivo Infusión Cerebro-Corazón (BHI). Se incubarán en agitación constante a 110 r.p.m. a 37°C durante 72 horas. Las colonias obtenidas se decantarán en tubos cónicos de 50 mL (Falcon).

Para la obtención de suspensión unicelular se centrifugarán los tubos a 3,500 r.p.m durante 10 minutos. Se removerá el excedente sobrenadante y se agregarán 20 mL de agua destilada para el “lavado” de las células. Los pasos de centrifugación y lavado de las células se repetirán a estas mismas especificaciones en otras dos ocasiones. Posteriormente, se retirará el excedente y las colonias obtenidas serán maceradas en un homogeneizador de cristal (Potter) durante 1min.

Esta suspensión es utilizada para inocular matraces Erlenmeyer de 2,000 mL con 400 mL de caldo de cultivo BHI, los cuales se incubarán a agitación constante a 110 r.p.m. a 37°C durante 72 horas.

A la masa obtenida, nuevamente se le realiza el proceso previamente descrito hasta obtener nuevamente una suspensión bacteriana unicelular. Este será

centrifugado a 100xg durante 10 minutos para remover el medio excedente, en dos ocasiones. Al botón resultante se le centrifugará de nueva cuenta a 3,500 r.p.m. durante 10 minutos y se suspenderá en volumen mínimo con solución salina para realizar la técnica de vaciado y extendido en placa para la cuenta bacteriana, descrita a continuación:

8.5.3 TÉCNICA DE VACIADO, DILUCIÓN SERIADA Y EXTENDIDO EN PLACA

En la campana de bioseguridad, previamente esterilizada, se prepararán seis tubos cónicos con 4.5 mL de agua destilada en cada uno. Los mencionados se rotularán con los números “-1”, “-2”, “-3”, “-4”, “-5” y “-6”, los cuales tienen la función de denominar diluciones subsecuentes. Del tubo cónico mencionado en el apartado 8.4.2, se tomarán 500 µL de P200 con micropipeta digital, el cual se añadirá al tubo rotulado como “-1” para completar un volumen total de 5mL. Tras homogeneizar el contenido, se tomará un volumen 500µL del tubo “-1” y se transferirá al tubo marcado con “-2”. Este mismo proceso se repetirá hasta llegar a la dilución “-6”.

De los tubos rotulados como “-4”, “-5” y “-6”, se tomarán 100 µL con micropipeta digital y se transferirán a tres placas de Petri diferentes con medio de cultivo agar sangre. Esto se realizará dos veces más, para obtener así nueve placas en total. Con una varilla de cristal previamente esterilizada, se extenderá el inóculo de manera uniforme en la totalidad de la placa, para luego incubarla a 37°C durante cinco días. Posteriormente, se realizará conteo total de las colonias presentes.

8.5.4 RECuento BACTERIANO EN PLACA MEDIANTE DILUCIONES SERIADAS

Se realizará un conteo manual de las UFC (unidades formadoras de colonias) obtenida en cada placa de Petri, tomando en cuenta únicamente aquellas cajas de Petri que contengan entre 30 y 300 colonias, con cifras más altas

reportándose como incontables. Se selecciona la dilución (“-4”, “-5”, “-6”) cuyo conteo sea el más representativo (entre 30 y 300 colonias), y se realiza un promedio entre las tres placas.

De esta forma, se obtiene un número aproximado de UFC $\times 10^y$ /mL, donde la variable “y” corresponde al inverso de la dilución realizada; por ejemplo, un conteo de 35 colonias en la dilución -5 correspondería a una cifra de 35 UFC $\times 10^5$ / mL.

Una vez obtenida la cuenta de UFC/mL del inóculo de P200, puede iniciarse el ensayo experimental en modelo murino, ajustando el volumen a inocular según los estándares posteriormente especificados:

8.5.5 ADMINISTRACIÓN DE PROFÁRMACO TEDIZOLID

Para los grupos que cuenten con aplicación de tedizolid, se administrará en el dorso del ratón BALB/c una dosis de 50 μ L/kg (Sivextro 200mg polvo) cada 24 horas durante 2 semanas. Este esquema de dos semanas constituye un ciclo. Se suspenderá la aplicación durante 1 semana y posteriormente se aplicará un segundo ciclo de la forma especificada, para completar un total de dos ciclos de dos semanas espaciados por una semana entre ambos.

8.5.6 ENSAYO EXPERIMENTAL EN MODELO MURINO

Se inocularán 160 ratones hembra BALB/c de 6-8 semanas de edad en el cojinete plantar izquierdo con 20 mg/50 μ L de inóculo de *N. brasiliensis* cepa HUJEG-1 (NBP0), obtenida de la colección del Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”. Se les permitirá desarrollar lesiones durante un transcurso de 12 semanas.

Poco antes de concluir este período, se evaluará a todos aquellos roedores con lesiones $\geq 2+$ y se seleccionarán 72 de los mismos. Se formarán 4 grupos; tedizolid (n=18), NBP200 (n=18), tedizolid + NBP200 (n=18) y un grupo control (n=18).

A ambos grupos con NBP200, se les administrará en el dorso la vacuna de 5×10^5 UFC de *N. brasiliensis* P200 emulsificada con adyuvante incompleto de Freud (Sigma); tres semanas después, se repetirá la aplicación de NBP200 mezclado con solución salina. De forma simultánea (es decir, tres semanas luego de la primera aplicación de NBP200) a los grupos con tedizolid se les administrará $50 \mu\text{L}/\text{kg}$ de forma intradérmica cada 24 horas por 2 semanas, suspendiendo las aplicaciones durante una semana, y repitiendo nuevamente por otro ciclo de dos semanas. Al grupo control se le administrarán 50 μL de solución salina 0.9% en el dorso.

Posteriormente, se realizará seguimiento durante 8-10 semanas y se realizará comparación de las medidas agrupadas en cada grupo, así como comparativa iconográfica.

8.5.7 EVALUACIÓN DE CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS

Se valorará la respuesta clínica de los ratones a las 0 y 8 semanas.

Se realizará una biopsia por curetaje del cojinete plantar infectado en un ratón de cada grupo, en aquellos que hayan presentado respuesta a la 8 semana.

Se realizará tinción de hematoxilina y eosina y se evaluarán los cambios histopatológicos.

8.5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis estadístico se utilizará el paquete estadístico SPSS versión 20.0 para Windows 7.

Las variables numéricas se resumirán en medidas de tendencia central y dispersión y las variables categóricas en frecuencias y porcentajes. Se realizarán comparaciones con T de Student y ANOVA para las variables paramétricas y U de Mann Whitney y Kruskal Wallis para las variables no paramétricas. Las variables categóricas se compararán mediante la prueba Chi cuadrada de Pearson. Se tomará un valor de $P < 0.05$ como estadísticamente significativo.

9.0 RESULTADOS

Se realizó el experimento como fue previamente descrito en el punto 8.4.6. Se inocularon 250 ratones BALB/c, hembras, de 8 semanas de edad, en el cojinete plantar derecho con 20mg/50 μ L de inóculo de *N. brasiliensis* cepa HUJEG-1. Se mantuvieron a libre evolución durante 12 semanas, tras lo cual se seleccionaron ratones con lesiones clínicas >2 cruces en escala de severidad, para crear 4 grupos de características homogéneas.

El grupo A, compuesto por 14 ratones, recibió la combinación de la cepa atenuada P200; el grupo B, recibió solamente la cepa atenuada P200; el grupo C, recibió tedizolid; mientras que el grupo D recibió solamente solución salina.

El cojinete plantar fue medido en sus tres dimensiones (largo, ancho y alto) por el investigador en la semana 1, semana 4, semana 6 y semana 8 (al concluir el experimento). Estas medidas pueden encontrarse representadas en la Tabla 1.1 y Tabla 1.2. Para facilitar la redacción de estos resultados, se realizaron medidas de tendencia central, las cuales se resumen en la Tabla 2.

Asimismo, se tomaron iconografías de seguimiento en la semana 1 y en la semana 8. Además, el investigador realizó estratificación clínica en la escala de severidad previamente mencionada (donde 0 cruces es ausencia de lesión clínica, y 1 cruz a 4 cruces expresan un espectro de gravedad de leve a moderado, a severo, y muy severo).

Posteriormente, los cuatro grupos se dejaron evolucionar libremente, sin recibir ningún tratamiento, durante 4 semanas más; de tal forma que también se incluyeron iconografías de la semana 12 para evaluar si los resultados obtenidos a

la semana 8 se mantenían luego de suspender la terapia. Estas fotografías son representadas en la Figura 1 y Figura 2.

Caja A - TDZ + P200																	
Semana 0				Semana 4				Semana 6				Semana 8					
Ratón	Largo	Ancho	Alto	Volumen (cm ³)	(+)	Ratón	Largo	Ancho	Alto	Volumen (cm ³)	(+)	Ratón	Largo	Ancho	Alto	Volumen (cm ³)	(+)
Ratón 1	15.30	10.30	5.50	0.87	4	Ratón 1	16.00	9.90	7.70	1.22	4	Ratón 1	13.60	8.00	6.00	0.65	3
Ratón 2	15.90	5.80	5.00	0.46	3	Ratón 2	14.20	6.70	6.60	0.63	3	Ratón 2	14.50	7.40	5.00	0.60	2
Ratón 3	18.10	11.30	6.20	1.27	4	Ratón 3	18.90	11.30	7.40	1.58	4	Ratón 3	18.30	10.60	6.30	1.22	3
Ratón 4	13.40	6.20	5.20	0.43	2	Ratón 4	15.20	7.70	6.70	0.78	3	Ratón 4	12.30	5.70	2.70	0.19	2
Ratón 5	14.60	6.40	5.80	0.54	3	Ratón 5	15.20	8.60	6.10	0.80	3	Ratón 5	12.30	5.80	4.00	0.29	4
Ratón 6	12.30	6.40	4.50	0.35	2	Ratón 6	13.50	7.90	5.10	0.54	2	Ratón 6	14.60	8.40	6.00	0.74	2
Ratón 7	15.90	11.20	6.20	1.10	4	Ratón 7	15.60	10.70	6.50	1.08	4	Ratón 7	15.50	9.90	9.30	1.43	4
Ratón 8	16.20	6.80	4.90	0.54	2	Ratón 8	15.10	7.20	6.50	0.71	3	Ratón 8	14.20	8.30	4.80	0.40	3
Ratón 9	16.20	6.00	6.60	0.64	2	Ratón 9	16.60	10.10	7.20	1.21	4	Ratón 9	13.60	5.80	4.20	0.33	2
Ratón 10	16.20	8.30	7.10	0.95	3	Ratón 10	14.20	5.30	4.60	0.35	2	Ratón 10	16.60	9.20	8.00	1.22	4
Ratón 11	13.80	5.80	3.50	0.28	2	Ratón 11	13.00	5.50	3.40	0.24	2	Ratón 11	13.20	4.90	3.80	0.25	2
Ratón 12	14.50	6.80	4.40	0.43	2	Ratón 12	13.80	7.10	4.10	0.40	3	Ratón 12	13.40	6.20	4.80	0.40	1
Ratón 13	13.90	5.40	3.90	0.29	2	Ratón 13	13.80	5.50	3.30	0.25	2	Ratón 13	13.40	5.40	3.70	0.27	3
Ratón 14	12.70	6.60	6.50	0.54	2	Ratón 14	14.10	6.60	5.80	0.54	3	Ratón 14	13.10	6.60	6.20	0.54	3
Media	14.93	7.38	5.38	0.59	2.64286	Media	14.94	7.86	5.79	0.68	3	Media	14.19	7.13	5.39	0.54	2.71429
DE	1.61	2.05	1.08	0.31	0.84	DE	1.53	1.99	1.45	0.40	0.78	DE	1.66	1.81	1.78	0.41	0.91

Caja B - P200																	
Semana 0				Semana 4				Semana 6				Semana 8					
Ratón	Largo	Ancho	Alto	Volumen (cm ³)	(+)	Ratón	Largo	Ancho	Alto	Volumen (cm ³)	(+)	Ratón	Largo	Ancho	Alto	Volumen (cm ³)	(+)
Ratón 1	14.30	10.20	5.10	0.74	3	Ratón 1	15.00	11.10	9.80	1.63	3	Ratón 1	14.20	10.30	4.90	0.72	4
Ratón 2	15.30	8.00	5.90	0.72	3	Ratón 2	16.20	8.40	7.20	0.98	4	Ratón 2	16.10	9.30	7.60	1.14	4
Ratón 3	14.10	7.20	6.80	0.69	3	Ratón 3	13.80	8.30	7.00	0.80	3	Ratón 3	14.90	9.30	5.60	0.78	4
Ratón 4	13.80	6.10	5.10	0.43	2	Ratón 4	12.10	5.80	5.10	0.36	3	Ratón 4	13.20	6.50	6.40	0.55	3
Ratón 5	13.90	9.10	3.60	0.46	3	Ratón 5	13.60	7.60	4.20	0.43	3	Ratón 5	15.00	8.10	4.30	0.52	4
Ratón 6	15.10	8.10	7.60	0.93	3	Ratón 6	14.60	7.90	5.70	0.66	3	Ratón 6	14.60	9.30	5.90	0.80	3
Ratón 7	14.50	5.90	5.50	0.47	2	Ratón 7	15.10	7.20	5.60	0.61	2	Ratón 7	13.50	5.80	4.40	0.34	2
Ratón 8	13.10	8.60	3.90	0.44	3	Ratón 8	13.50	6.00	4.10	0.38	3	Ratón 8	16.10	8.60	4.90	0.68	3
Ratón 9	14.40	5.90	5.50	0.47	2	Ratón 9	13.10	5.00	4.90	0.32	2	Ratón 9	11.80	4.80	4.40	0.26	2
Ratón 10	15.80	7.80	5.60	0.69	2	Ratón 10	15.70	5.90	5.60	0.52	2	Ratón 10	14.70	6.30	6.80	0.63	4
Ratón 11	14.90	7.50	2.60	0.29	2	Ratón 11	15.70	7.50	4.20	0.49	3	Ratón 11	14.80	8.10	3.70	0.44	3
Ratón 12	13.90	10.50	5.90	0.86	2	Ratón 12	14.40	9.10	5.30	0.69	2	Ratón 12	13.50	6.60	4.40	0.39	2
Ratón 13	14.10	6.90	5.50	0.54	3	Ratón 13	14.40	5.40	3.90	0.30	2	Ratón 13	13.40	6.90	2.70	0.25	4
Ratón 14	16.20	10.80	5.40	0.94	4	Ratón 14	14.80	10.20	5.30	0.80	4	Ratón 14	15.60	10.50	6.00	0.98	4
Media	14.53	8.04	5.29	0.62	2.57143	Media	14.43	7.59	5.56	0.61	2.78571	Media	14.39	7.89	5.16	0.59	3.28571
DE	0.84	1.64	1.26	0.21	0.51	DE	1.12	1.78	1.57	0.35	0.70	DE	1.21	1.76	1.31	0.26	0.83

Tabla 1.1. Dimensiones de la pata trasera derecha de los ratones evaluados, representadas a través del tiempo en cuatro mediciones seriadas. Se presentan los datos del Grupo A (P200 + Tedizolid) y grupo B (P200 en monoterapia).

Caja C - TDZ																	
Semana 0				Semana 4				Semana 6				Semana 8					
Ratón	Largo	Ancho	Alto	Volumen (cm ³)	(+)	Ratón	Largo	Ancho	Alto	Volumen (cm ³)	(+)	Ratón	Largo	Ancho	Alto	Volumen (cm ³)	(+)
Ratón 1	12.70	6.20	4.80	0.38	2	Ratón 1	13.20	8.40	6.50	0.72	3	Ratón 1	12.40	7.00	4.60	0.40	2
Ratón 2	13.40	9.60	2.40	0.31	2	Ratón 2	13.90	5.70	4.50	0.36	2	Ratón 2	12.80	6.00	2.90	0.22	2
Ratón 3	13.80	5.50	4.70	0.36	2	Ratón 3	14.30	7.00	6.40	0.64	3	Ratón 3	14.70	7.30	6.40	0.69	3
Ratón 4	16.90	7.30	9.80	1.21	3	Ratón 4	15.10	8.30	8.60	1.08	3	Ratón 4	15.50	7.90	6.90	0.84	3
Ratón 5	12.80	10.00	6.50	0.83	3	Ratón 5	14.90	6.70	7.20	0.72	3	Ratón 5	13.80	7.00	6.30	0.61	3
Ratón 6	12.10	5.10	4.10	0.25	2	Ratón 6	13.50	7.60	5.40	0.55	2	Ratón 6	13.90	9.70	5.70	0.77	4
Ratón 7	12.80	5.80	5.50	0.41	2	Ratón 7	13.50	6.00	6.20	0.50	2	Ratón 7	13.20	5.90	6.10	0.48	2
Ratón 8	14.50	7.00	6.30	0.64	2	Ratón 8	14.60	8.10	5.50	0.65	3	Ratón 8	14.80	7.10	5.50	0.58	2
Ratón 9	11.90	9.00	3.00	0.32	3	Ratón 9	12.80	7.70	4.30	0.42	3	Ratón 9	11.40	6.80	3.20	0.25	2
Ratón 10	14.30	5.90	4.50	0.38	2	Ratón 10	14.90	8.00	6.70	0.80	2	Ratón 10	14.70	8.10	8.20	0.98	2
Ratón 11	12.10	8.40	2.70	0.27	3	Ratón 11	13.20	7.70	4.00	0.41	2	Ratón 11	11.00	6.80	2.70	0.20	3
Ratón 12	13.70	7.30	5.80	0.58	2	Ratón 12	12.20	9.50	8.10	0.94	3	Ratón 12	12.60	9.40	7.20	0.85	2
Ratón 13	14.90	9.90	5.40	0.80	3	Ratón 13	15.90	10.50	5.40	0.90	4	Ratón 13	16.00	9.30	6.10	0.91	3
Ratón 14	15.20	6.90	5.30	0.56	2	Ratón 14	15.90	7.40	5.60	0.66	3	Ratón 14	14.20	6.20	3.60	0.32	3
Media	13.65	7.42	5.06	0.51	2.35714	Media	14.14	7.76	6.03	0.66	2.71429	Media	13.64	7.46	5.39	0.55	2.57143
DE	1.41	1.69	1.87	0.27	0.50	DE	1.13	1.26	1.35	0.21	0.61	DE	1.48	1.25	1.72	0.27	0.65

Caja D - Grupo Control (SS)																	
Semana 0				Semana 4				Semana 6				Semana 8					
Ratón	Largo	Ancho	Alto	Volumen (cm ³)	(+)	Ratón	Largo	Ancho	Alto	Volumen (cm ³)	(+)	Ratón	Largo	Ancho	Alto	Volumen (cm ³)	(+)
Ratón 1	14.40	6.70	4.90	0.47	3	Ratón 1	15.00	8.80	6.00	0.79	3	Ratón 1	14.00	8.00	5.70	0.64	4
Ratón 2	12.90	10.10	4.10	0.53	3	Ratón 2	13.50	8.00	9.40	1.02	4	Ratón 2	14.60	8.20	5.60	0.67	3
Ratón 3	13.90	7.30	6.70	0.68	2	Ratón 3	15.70	8.60	9.40	1.27	3	Ratón 3	14.70	8.20	8.40	1.01	3
Ratón 4	12.60	6.90	5.40	0.47	2	Ratón 4	13.80	7.50	5.50	0.57	2	Ratón 4	12.80	6.50	3.90	0.32	2
Ratón 5	12.40	6.00	3.90	0.29	1	Ratón 5	12.90	5.60	4.30	0.31	2	Ratón 5	12.80	5.00	3.20	0.20	2
Ratón 6	13.80	6.90	2.70	0.26	2	Ratón 6	12.90	6.10	3.50	0.28	2	Ratón 6	12.70	5.90	4.50	0.34	2
Ratón 7	13.50	9.00	3.10	0.38	3	Ratón 7	13.30	6.70	3.30	0.29	2	Ratón 7	12.90	7.40	7.20	0.69	2
Ratón 8	12.30	6.00	5.20	0.38	2	Ratón 8	12.60	6.40	6.00	0.48	2	Ratón 8	12.70	6.80	5.50	0.47	2
Ratón 9	13.90	7.30	8.20	0.83	2	Ratón 9	14.30	7.50	7.30	0.78	3	Ratón 9	14.40	8.30	7.00	0.84	3
Ratón 10	14.40	7.00	5.20	0.52	3	Ratón 10	14.90	8.70	6.20	0.80	4	Ratón 10	15.60	9.40	6.10	0.89	4
Ratón 11	15.50	9.10	7.10	1.00	3	Ratón 11	16.60	10.30	8.90	1.52	4	Ratón 11	16.20	10.30	8.60	1.43	4
Ratón 12	16.00	7.70	4.10	0.51	3	Ratón 12	14.70	8.40	5.50	0.68	2	Ratón 12	15.40	7.50	6.10	0.70	3
Ratón 13	14.30	7.40	6.10	0.65	2	Ratón 13	15.50	6.40	6.50	0.64	2	Ratón 13	13.90	5.80	4.80	0.39	2
Ratón 14	14.00	5.80	5.10	0.41	2	Ratón 14	14.50	6.70	5.60	0.54	3	Ratón 14	14.90	8.30	5.90	0.73	3
Media	13.85	7.37	5.13	0.52	2.35714	Media	14.30	7.55	6.24	0.67	2.71429	Media	14.11	7.54	5.89	0.63	2.78571
DE	1.08	1.25	1.53	0.21	0.68	DE	1.19	1.31	1.96	0.36	0.83	DE	1.19	1.44	1.55	0.32	0.80

Tabla 1.2. Dimensiones de la pata trasera derecha de los ratones evaluados, representadas a través del tiempo en cuatro mediciones seriadas. Se presentan los datos del Grupo C (Tidizolid en monoterapia) y grupo D (control con solución salina).

	P200 + TDZ				P200				Tedizolid				Control			
	Largo	Ancho	Alto	Volumen	Largo	Ancho	Alto	Volumen	Largo	Ancho	Alto	Volumen	Largo	Ancho	Alto	Volumen
Semana 1	14.92 (1.61)	7.37 (2.05)	5.37 (1.07)	0.59 (0.30)	14.52 (0.84)	8.04 (1.64)	5.28 (1.26)	0.61 (0.20)	13.65 (1.41)	7.42 (1.68)	5.05 (1.86)	0.51 (0.27)	13.85 (1.08)	7.37 (1.25)	5.12 (1.531)	0.52 (0.20)
Semana 4	14.94 (1.52)	7.86 (1.98)	5.78 (1.45)	0.675 (0.40)	14.42 (1.12)	7.58 (1.77)	5.56 (1.57)	0.607 (0.35)	14.133 (1.13)	7.75 (1.25)	6.02 (1.35)	0.66 (0.21)	14.3 (1.19)	7.55 (1.31)	6.24 (1.95)	0.67 (0.36)
Semana 6	14.18 (1.664)	7.12 (1.81)	5.38 (1.77)	0.54 (0.40)	14.385 (1.20)	7.88 (1.75)	5.15 (1.30)	0.58 (0.26)	13.64 (1.48)	7.46 (1.25)	5.38 (1.72)	0.54 (0.27)	14.11 (1.19)	7.54 (1.44)	5.89 (1.55)	0.62 (0.32)
Semana 8	14.57 (2.07)	8.09 (3.30)	5.15 (1.60)	0.60 (0.51)	14.47 (1.37)	8.38 (1.70)	5.95 (1.54)	0.72 (0.32)	13.87 (1.37)	8.14 (1.32)	6.07 (1.39)	0.68 (0.25)	14.6 (1.096)	7.66 (1.52)	6 (1.81)	0.67 (0.42)
Δ	-0.36	0.71	-0.23	0.01	-0.06	0.34	0.66	0.10	0.23	0.72	1.01	0.17	0.75	0.29	0.87	0.15

Tabla 2. Dimensiones de la pata trasera derecha de los ratones evaluados, descritas en mediana con desviación estándar. Asimismo, Δ representa la diferencia entre la Semana 8 y la Semana 1 (con valores negativos representando disminución en el tamaño en comparación con el inicial).

Por otra parte, con la finalidad de facilitar el análisis, también se clasificó el resultado final en Empeoramiento o No Empeoramiento, para realizar valorar la misma como una variable dicotómica. Estas variables se denominaron de esta forma siguiendo la corriente de pensamiento de nuestra hipótesis: el curso natural de la enfermedad se reflejaría en incremento en la severidad de las lesiones, por lo cual una intervención que detenga el curso natural de la enfermedad sin necesariamente producir una mejoría, se considera una intervención eficaz. Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 3.

	Empeoramiento	No Empeoramiento
P200 + Tedizolid	7	6
P200	8	6
Tedizolid	9	5
Control	13	1

$P = 0.115$

Tabla 3. Análisis dicotómico en función del arresto en la progresión de la enfermedad, expresada como Empeoramiento clínico de las lesiones.

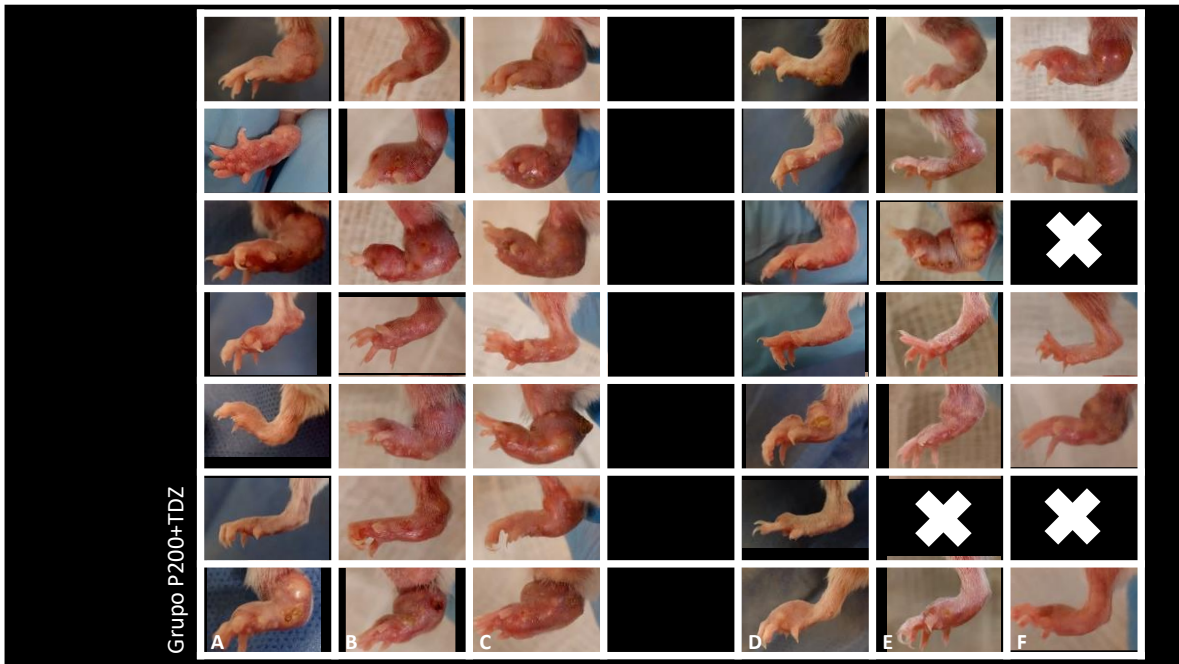


Figura 1. Iconografías de la pata inoculada de los ratones del grupo A, representando la semana 1 (columnas A y D), la semana 8 (columnas B y E) y la semana 12, luego de 4 semanas sin tratamiento (columnas C y F). Las celdas con cruces representan pérdidas en la población.



Figura 2. Iconografías de la pata inoculada de los ratones del grupo B, representando la semana 1 (columnas A y D), la semana 8 (columnas B y E) y la semana 12, luego de 4 semanas sin tratamiento (columnas C y F).

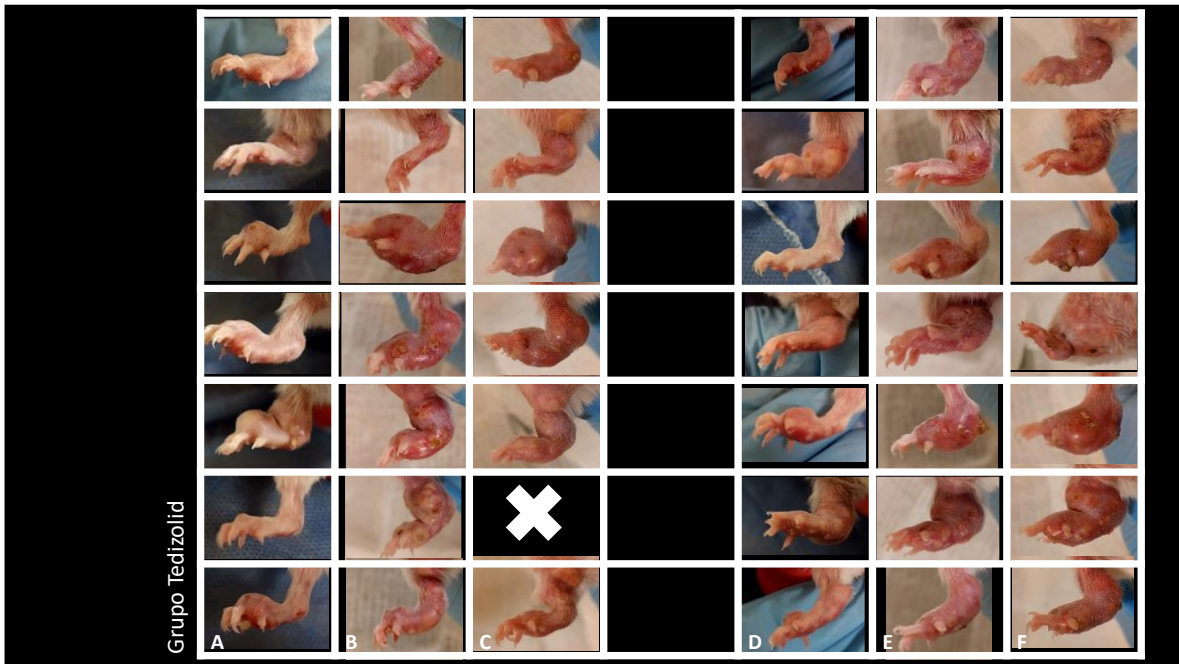


Figura 3. Iconografías de la pata inoculada de los ratones del grupo C, representando la semana 1 (columnas A y D), la semana 8 (columnas B y E) y la semana 12, luego de 4 semanas sin tratamiento (columnas C y F). Las celdas con cruces representan pérdidas en la población.

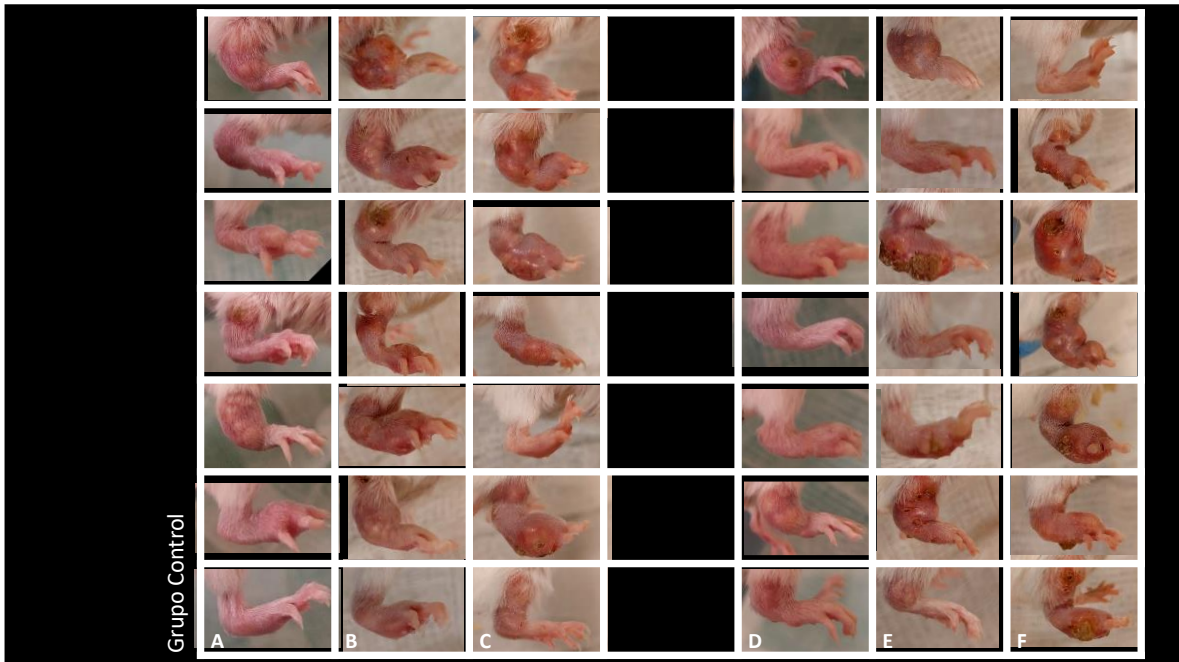


Figura 4. Iconografías de la pata inoculada de los ratones del grupo D, representando la semana 1 (columnas A y D), la semana 8 (columnas B y E) y la semana 12, luego de 4 semanas sin tratamiento (columnas C y F).

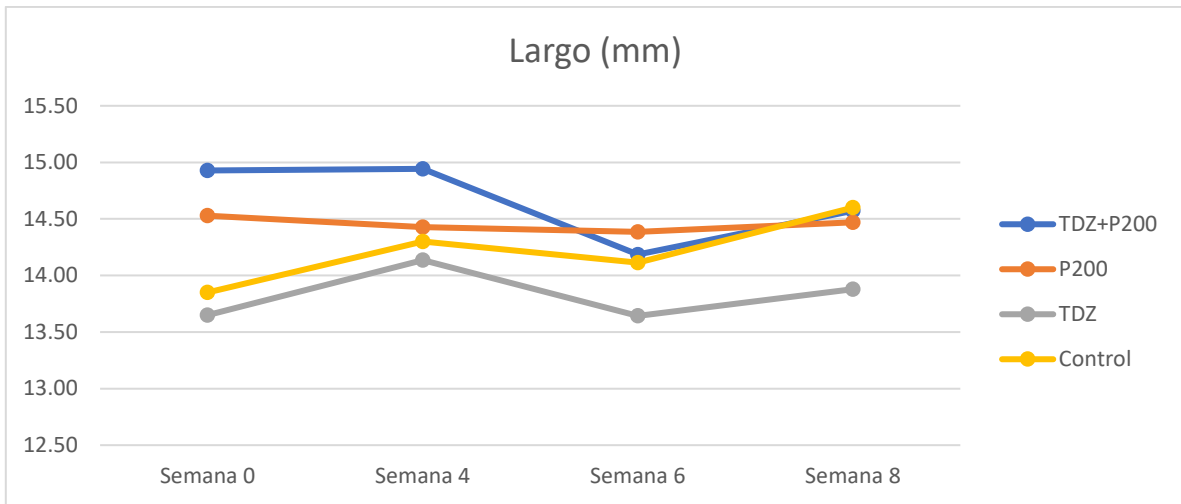


Figura 5. Diagrama que representa el largo medido en milímetros de las lesiones producidas a lo largo de 8 semanas de seguimiento en los ratones.

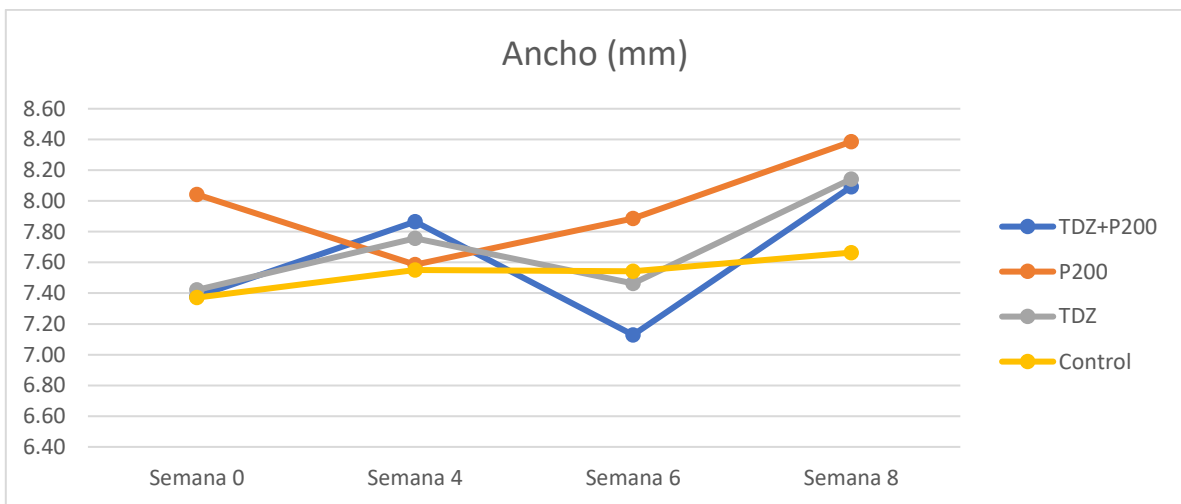


Figura 6. Diagrama que representa el ancho medido en milímetros de las lesiones producidas a lo largo de 8 semanas de seguimiento en los ratones.

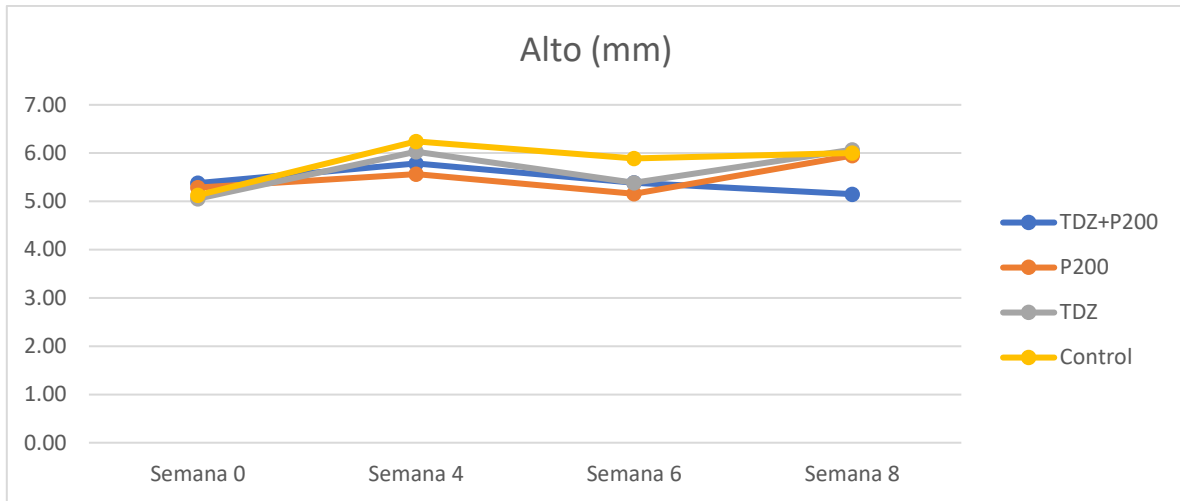


Figura 7. Diagrama que representa el alto medido en milímetros de las lesiones producidas a lo largo de 8 semanas de seguimiento en los ratones.

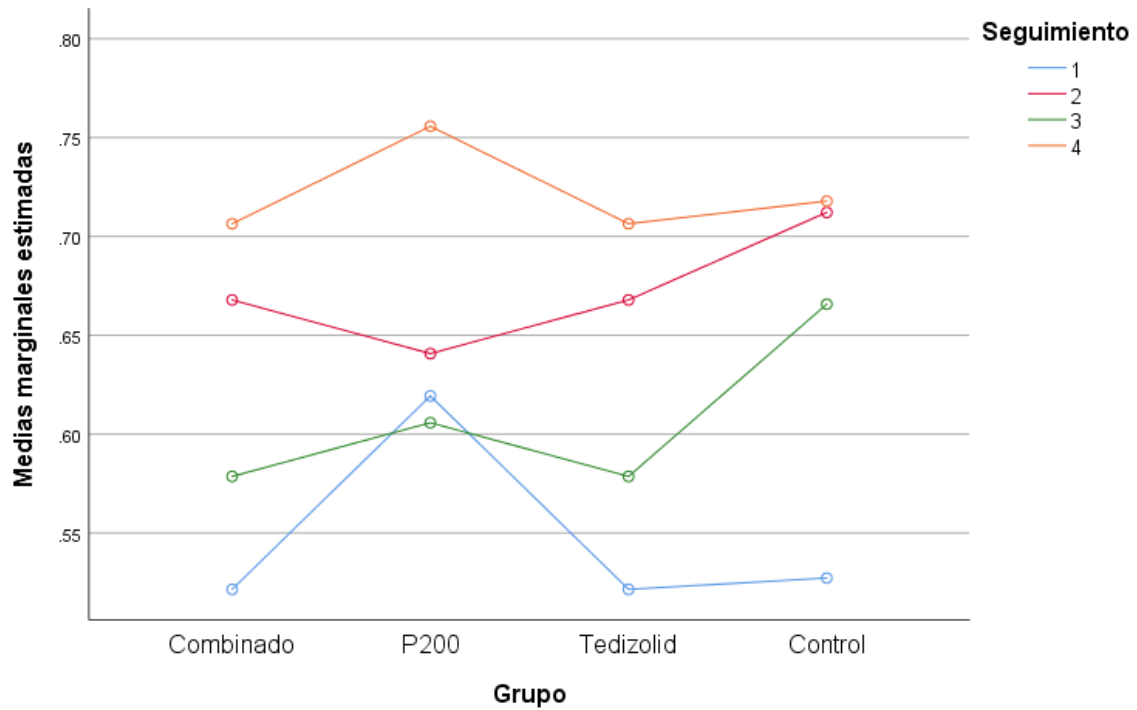


Figura 8. Diagrama que representa el volumen aproximado en centímetros cúbicos de las lesiones producidas a lo largo de 8 semanas de seguimiento en los ratones. Esta medida se obtuvo al multiplicar las tres medidas anteriores siguiendo la fórmula para volumen de un prisma rectangular.

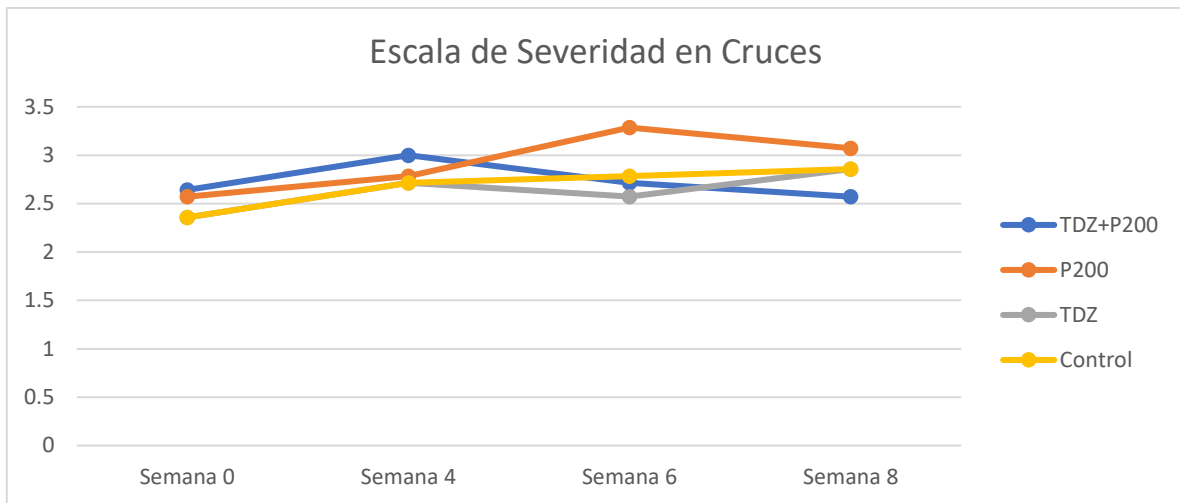


Figura 9. Diagrama que representa la severidad de las lesiones producidas a lo largo de 8 semanas de seguimiento en los ratones.

Además, el análisis histopatológico demostró diferencias claras en el infiltrado inflamatorio y en las características de los granos presentados.

El ratón del grupo control demostró una afección por el patógeno mucho más intensa, presentando un número mayor de granos en el tejido, los cuales se presentaban viables (con estructura espiculada, tinción basófila, morfología arriñonada. Estos granos se encontraban rodeados por un infiltrado denso de células polimorfonucleares, las cuales rodeaban el grano bacteriano formando una banda/corona inflamatoria a su alrededor. Interesantemente, esta banda no era continua, puesto que existían “espinas” de bacterias que separaban a los neutrófilos entre sí. Los abscesos tenían numerosas áreas de necrosis. Entre cada absceso existían delgadas trabéculas compuestas por fibroblastos y macrófagos espumosos (Figura 10).

Por otra parte, en los tres grupos con intervención se encontraron datos de una respuesta inmune más intensa, incluyendo al grupo que recibió la cepa atenuada NBP200. Entre estos datos se reúnen características como: granos más pálidos, eosinófilos, amorfos. Los neutrófilos poseían un núcleo picnótico, eran menos abundantes, pero estaban acompañados también de células mononucleares, constituyendo así un infiltrado mixto. Las células que rodean a los granos buscando encapsularlos forman una banda continua, sin espículas, dándole al grano así un borde más “romo” y fácil de delimitar. Las áreas de necrosis habían sido reemplazadas por áreas de material amorfo eosinófilo, sugestivo de detritus celulares, y por áreas de tejido conectivo más gruesas que las encontradas en el grupo control, puesto que también poseían infiltrado inflamatorio en su interior (Figura 11, Figura 12, Figura 13).

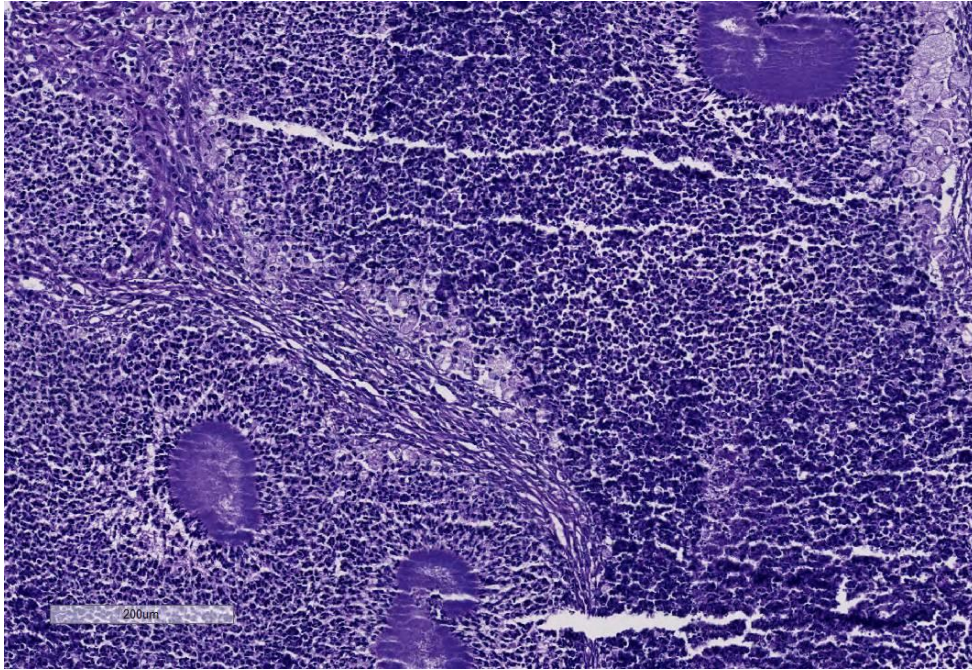


Figura 10. Hallazgos histopatológicos en un ratón sin tratamiento, luego de 8 semanas.

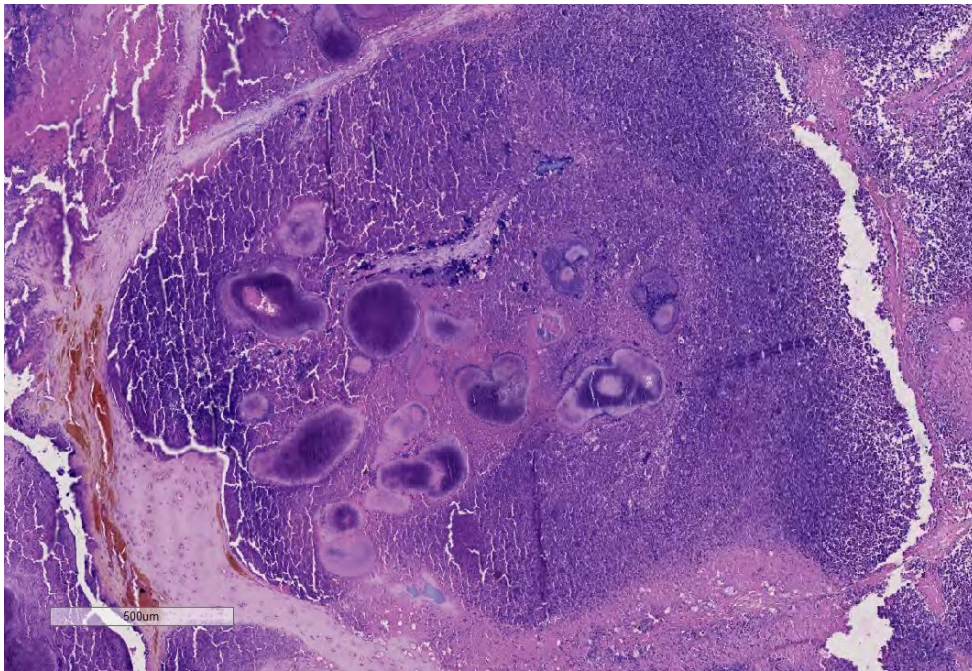


Figura 11. Hallazgos histopatológicos en un ratón tratado con cepa atenuada NBP200, luego de 8 semanas.

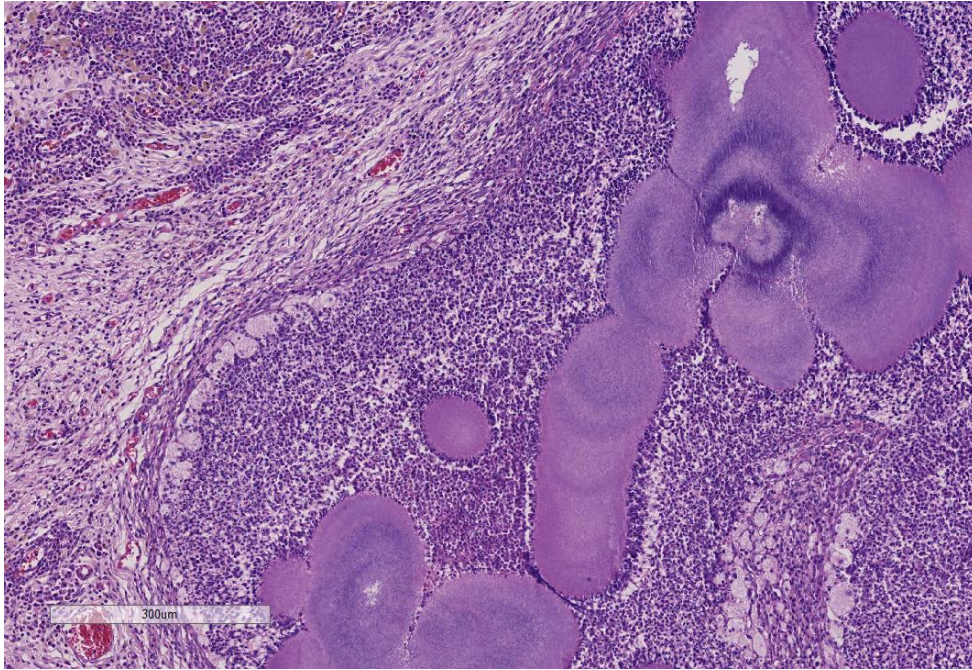


Figura 12. Hallazgos histopatológicos en un ratón tratado con tedizolid, luego de 8 semanas.

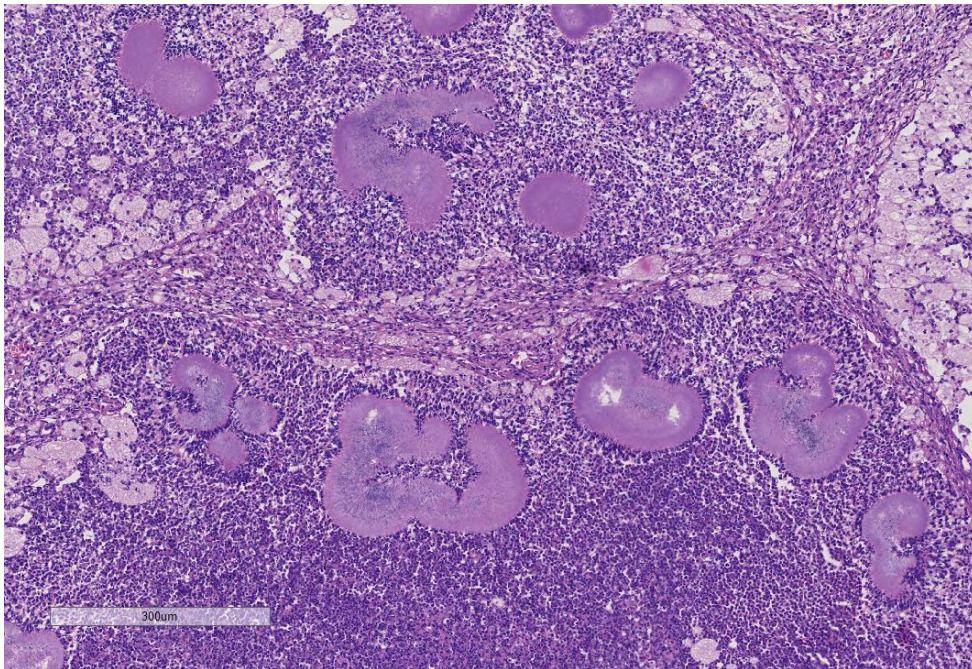


Figura 13. Hallazgos histopatológicos en un ratón tratado con NBP200 y tedizolid, luego de 8 semanas.

10.0 DISCUSIÓN

Esta tesis busca seguir la línea de investigación de nuestro equipo de trabajo, la cual ha demostrado que una cepa atenuada de *Nocardia brasiliensis* es incapaz de producir lesiones clínicamente significativas en un modelo murino, y además permite al hospedero adquirir un estado de resistencia ante la cepa parental⁶³. Una opción terapéutica sería emplear esta bacteria debilitada como una vacuna en individuos que no responden bien a los tratamientos convencionales, que presentan un riesgo elevado de propagación y/o que son propensos a reacciones tóxicas a los medicamentos. En un estudio subsecuente se encontró que la inoculación de cepas subcultivadas 200 y 400 veces es capaz de modificar la progresión natural de un actinomicetoma, al reducir la producción de las lesiones clínicas⁶⁵.

El propósito de esta investigación fue poner a prueba estos resultados contra un fármaco empleado como terapia estándar en el tratamiento del actinomicetoma. El tedizolid ha demostrado ser eficaz en el tratamiento del actinomicetoma⁷⁰, por lo que en este estudio se utilizó como grupo comparador además del grupo con placebo.

Los resultados descritos en la Tabla 2 demuestran que, en todas las terapias utilizadas, la tendencia natural del actinomicetoma es aumentar en sus dimensiones a través del tiempo. No obstante, la progresión observada es mucho menor en el grupo A (P200 combinado con Tedizolid) en comparación con los otros grupos. Y no obstante, esperaríamos encontrar resultados similares, aunque fuesen en menor proporción, en el grupo P200 y grupo Tedizolid en monoterapia al compararlos con el grupo placebo. Esto quizás pueda explicarse por las características iniciales de

las lesiones incluidas en el estudio (las cuales pueden revisarse en la Tabla 1.1 y Tabla 1.2), puesto que los ratones que forman parte de este protocolo poseían lesiones de $\geq 2+$, lo cual corresponde a tumoraciones de proporciones moderadas, severas y muy severas (distinto a lo presentado por García-Lozano y colaboradores).

Se realizó una comparación utilizando ANOVA de medidas repetidas para evaluar el tamaño de las lesiones a lo largo del tiempo en cada grupo. Se realizó un análisis del Volumen, considerando que esta medida sería la que de forma más factible refleje el estado clínico de las lesiones. Este análisis no demostró significancia estadística, pero como se exhibe en la figura 8, la tendencia es que todos los grupos con intervención presenten una diferencia en sus medias en comparación con el grupo control en la medición de la semana 4. En particular el grupo de P200 presentó mayor mejoría; no obstante, esta superioridad del grupo de P200 no se mantuvo para la semana 6 (aunque todos los grupos continuaban presentando menor progresión en comparación al placebo). En la medición final, de la semana 8, esta mejoría no se mantuvo.

Y sin embargo, hay factores relacionados a la actividad patógena que no pueden evaluarse de forma adecuada en las medidas previamente establecida. Estos incluyen datos como la intensidad del eritema, turgencia de la piel, la presencia de pústulas o áreas blancas desestructuradas, y bandas rosa-gris sugestivas de fibrosis. Estos factores son francamente subjetivos, evaluados de forma directa por el investigador mediante el seguimiento iconográfico presentado en las Figuras 1 a 4. Al revisar estos datos, percibimos una clara disminución del eritema y apariencia más sugestiva de procesos cicatrizales en todos los grupos intervención a la semana 8, donde el grupo combinado (P200 + Tedizolid) demostró

la mejoría más clara. Por otra parte, el grupo control mantuvo progresión de la enfermedad hasta la semana 8.

Por otro lado, además de evaluar las dimensiones (Largo, Ancho, Alto y Volumen) y la severidad clínica, también se estratificó el resultado final en Empeoramiento o No Empeoramiento, lo cual permitió un análisis dicotómico del mismo (Tabla 3). Como fue mencionado anteriormente, la progresión natural de la enfermedad se reflejaría en incremento en la severidad de las lesiones, por lo cual una intervención que detenga el curso natural de la enfermedad se considera una intervención eficaz (esto, sin necesariamente producir una mejoría). Los hallazgos mostrados en esta tabla claramente reflejan una tendencia a que los ratones del grupo control empeoren clínicamente tras el paso de 8 semanas, mientras que en comparación las tres intervenciones (P200, Tedizolid y la combinación de ambos) logran frenar esta progresión.

Un dato interesante es que luego de permitir que los cuatro grupos se dejasen evolucionar libremente, sin recibir ningún tratamiento durante 4 semanas más, ninguno de ellos fue capaz de mantener esta mejoría. Esto sugiere que cualquiera de las intervenciones es capaz de detener la progresión de la enfermedad en actinomicetomas de severidad moderada a grave, pero ninguno es capaz de sostener este arresto si las terapias no se continúan.

Por otra parte, nuestros hallazgos histopatológicos son atractivos, ya que el grupo con NBP200 demuestra datos de respuesta inmune intensa y capaz, con granos bacterianos poco viables y menos numerosos; tejido conectivo e infiltrado inflamatorio abundante, de características mixtas; y menos áreas de necrosis.

11.0 CONCLUSIONES

Nuestra investigación, en concordancia con investigaciones previas del equipo, sostiene que la cepa atenuada de *Nocardia brasiliensis* tiene el potencial de funcionar como una vacuna. En este análisis experimental de NBP200 como tratamiento modulador de la respuesta inmunológica en modelos murinos BALB/c con actinomicetoma, se logró detener la progresión en el tamaño y en la severidad clínica de las lesiones en ratones inoculados con una cepa atenuada NBP200 al compararlo contra placebo.

En comparación con el tratamiento estándar tedizolid, el uso combinado de la cepa P200 y tedizolid demostró una menor progresión en las dimensiones de las lesiones en un modelo murino de actinomicetoma. Sin embargo, el grupo P200 y el grupo tedizolid en monoterapia no mostraron mejoras significativas en comparación con el grupo placebo, lo que puede atribuirse a las características iniciales de las lesiones incluidas en el estudio.

Aunque el análisis del volumen no reveló significancia estadística, se observó una tendencia a una diferencia en las medias entre los grupos con intervención y el grupo control en la medición de la semana 4. Notablemente, el grupo P200 mostró una mejoría más marcada, pero esta superioridad no se mantuvo en la semana 6 ni en la medición final de la semana 8.

Importantemente, factores clínicos no medibles de forma objetiva, como la intensidad del eritema, turgencia de la piel y otras características evaluadas visualmente, sugieren que las intervenciones, especialmente la combinación de P200 y tedizolid, mostraron mejoras notables en comparación con el grupo control.

La estratificación de los resultados en empeoramiento o no empeoramiento respalda la tendencia observada en las dimensiones y severidad clínica. Los grupos de intervención lograron frenar la progresión de la enfermedad, mientras que el grupo control experimentó un empeoramiento clínico.

A pesar de la mejoría observada durante la intervención, el seguimiento sin tratamiento adicional durante 4 semanas indicó que ninguna de las intervenciones pudo mantener la mejoría. Esto sugiere que, aunque son eficaces para detener la progresión de actinomicetomas de severidad moderada a grave, se requiere continuidad en las terapias para mantener estos efectos positivos.

En conclusión, se necesitan investigaciones adicionales para determinar la dosis y la duración adecuadas de NBP200. Este estudio refleje la viabilidad de emplear adyuvantes para alterar el curso natural de la infección.

12.0 REFERENCIAS

1. Organization WH. Mycetoma, chromoblastomycosis and other deep mycoses. World Health Organization. Published 2021. Accessed June 7, 2021. <https://www.who.int/health-topics/mycetoma-chromoblastomycosis-and-other-deep-mycoses>
2. Drugs for Neglected Diseases Initiative. Mycetoma is added to WHO list of 'Neglected Tropical Diseases. Published 2016. Accessed June 7, 2021. <https://dndi.org/press-releases/2016/mycetoma-who-ntd-list-response/>
3. Reis CMS, Reis-Filho EG de M. Mycetomas: An epidemiological, etiological, clinical, laboratory and therapeutic review. *An Bras Dermatol*. 2018;93(1):8-18. doi:10.1590/abd1806-4841.20187075
4. Berger H, Hesse K. [Description of the madura foot by Engelbert Kaempfer (1651-1716)]. *Hautarzt*. 1969;20(4):182-185.
5. Carter HV. The Etiology of Madura Foot. *Ind Med Gaz*. 1874;9(8):220.
6. Hay RJ. Mycetoma - a history of the first contributions to the description of the disease and its pathogenesis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2021;115(4):283-286. doi:10.1093/trstmh/traa134
7. McQuestin C. Fungous foot of India. *Pac Med Surg J*. 1874;(7):552-556.
8. Cicero R. El micetoma. *Gac Med Mex*. 1912;7(6):283-300.
9. Ocaranza R. El micetoma en Sonora. *Bol Cienc Med Mex*. 1914;4:443.
10. Zijlstra EE, van de Sande WWJ, Welsh O, Mahgoub ES, Goodfellow M, Fahal AH. Mycetoma: a unique neglected tropical disease. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(1):100-112. doi:10.1016/S1473-3099(15)00359-X
11. Verma P, Jha A. Mycetoma: reviewing a neglected disease. *Clin Exp Dermatol*. 2019;44(2):123-129. doi:10.1111/ced.13642
12. Bonifaz A, Tirado-Sánchez A, Calderón L, et al. Mycetoma: Experience of 482 Cases in a Single Center in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(8). doi:10.1371/journal.pntd.0003102
13. Samy AM, van de Sande WWJ, Fahal AH, Peterson AT. Mapping the potential risk of mycetoma infection in Sudan and South Sudan using ecological niche modeling. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(10):e3250. doi:10.1371/journal.pntd.0003250
14. van de Sande WWJ. Global Burden of Human Mycetoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(11). doi:10.1371/journal.pntd.0002550
15. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Bonifaz A, et al. [Update on the epidemiology of mycetoma in Mexico. A review of 3933 cases]. *Gac Med Mex*. 2013;149(5):586-592.
16. Cárdenas-de la Garza JA, Welsh O, Cuéllar-Barboza A, et al. Clinical characteristics and treatment of actinomycetoma in northeast Mexico: A case series. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(2):1-14. doi:10.1371/journal.pntd.0008123

17. Welsh O, Vera-Cabrera L, Salinas-Carmona MC. Mycetoma. *Clin Dermatol*. 2007;25(2):195-202. doi:10.1016/j.clindermatol.2006.05.011
18. Saarinen KA, Lestringant GG, Czechowski J, Frossard PM. Cutaneous nocardiosis of the chest wall and pleura--10-year consequences of a hand actinomycetoma. *Dermatology*. 2001;202(2):131-133. doi:10.1159/000051613
19. Shanbhag NU, Karandikar S, Deshmukh PA. Disseminated orbital actinomycetoma: a case report. *Indian J Ophthalmol*. 2010;58(1):60-63. doi:10.4103/0301-4738.58474
20. Salinas-Carmona MC, de los Angeles Castro-Corona M, Licon-Trillo A, et al. Constrictive pericarditis and recurrent mycetoma due to *Nocardia brasiliensis* in non-immunocompromised patient. *J Mycol Med*. 1997;7:47-50.
21. Welsh O, Lopez R. Micetoma con diseminación pulmonar. *Med Cut Iber Lat*. 1997;13:517-523.
22. Aguirre L, Ariza R, Frati A, Torrero M, L.M. T. Obstrucción de la vena cava superior secundaria a micetoma por *Nocardia brasiliensis*. *Rev Med IMSS Mex*. 1985;23:227-229.
23. Welsh O, Vera-Cabrera L, Welsh E, Salinas MC. Actinomycetoma and advances in its treatment. *Clin Dermatol*. 2012;30(4):372-381. doi:10.1016/j.clindermatol.2011.06.027
24. Siddig EE, van de Sande WWJ, Fahal AH. Actinomycetoma laboratory-based diagnosis: a mini-review. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2021;115(4):355-363. doi:10.1093/trstmh/traa176
25. Ahmed AA, van de Sande W, Fahal AH. Mycetoma laboratory diagnosis: Review article. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(8):e0005638. doi:10.1371/journal.pntd.0005638
26. Hay R, Denning DW, Bonifaz A, et al. The Diagnosis of Fungal Neglected Tropical Diseases (Fungal NTDs) and the Role of Investigation and Laboratory Tests: An Expert Consensus Report. *Trop Med Infect Dis*. 2019;4(4). doi:10.3390/tropicalmed4040122
27. Siddig EE, Mhmoud NA, Bakhiet SM, et al. The Accuracy of Histopathological and Cytopathological Techniques in the Identification of the Mycetoma Causative Agents. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(8):e0007056. doi:10.1371/journal.pntd.0007056
28. Chhatwal P, Woltemate S, Ziesing S, Welte T, Schlüter D, Vital M. Molecular characterization and improved diagnostics of *Nocardia* strains isolated over the last two decades at a German tertiary care center. *EXCLI J*. 2021;20:851-862. doi:10.17179/excli2021-3787
29. González-Ochoa A, Shields J, Vázquez P. Acción de la 4-4 diamino-difenil-sulfona frente a *Nocardia brasiliensis* (estudios in vitro de la infección experimental y en clínica). *Gac Med Mex*. 1952;52:345-353.
30. Latapi F, Lavalle P. Emploi des sulfones et de L'isoniazide dans le traitement des mycetomes. In: VIII Congres International de Botanique; 1954.
31. Welsh O. Mycetoma. Current concepts in treatment. *Int J Dermatol*. 1991;30(6):387-398.
32. Welsh O, Saucedo E, Gonzalez J, Ocampo J. Amikacin alone and in combination with trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of actinomycotic mycetoma. *J Am Acad Dermatol*. 1987;17(3):443-448.

33. Agarwal P, Jagati A, Rathod S, Kalra K, Patel S, Chaudhari M. Clinical Features of Mycetoma and the Appropriate Treatment Options. *Res Rep Trop Med*. 2021;8(12):173-179.
34. Damle D, Mahajan P, Pradhan S, Belgaumkar V, Gosavi A, Tolat S. Modified Welsh regimen: a promising therapy for actinomycetoma. *J Drugs Dermatology - JDD*. 2008;7(9):853-856.
35. Welsh O, Al-Abdely H, Salinas-Carmona M, Fahal A. Mycetoma Medical Therapy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(10):e3218.
36. Suleiman S, el Wadaella S, Fahal A. The surgical treatment of mycetoma. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:1-9.
37. Almaguer-Chavez JA. Efecto del subcultivo en la virulencia de *Nocardia brasiliensis*. Published online 2013. eprints.uanl.mx/3209
38. Salinas-Carmona MC, Pérez-Rivera I. Humoral immunity through immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by *Nocardia brasiliensis*. *Infect Immun*. 2004;72(10):5597-5604. doi:10.1128/IAI.72.10.5597-5604.2004
39. Ericsson AC, Crim MJ, Franklin CL. A brief history of animal modeling. *Mo Med*. 2013;110(3):201-205. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23829102>
40. Storrs EE. The nine-banded armadillo: a model for leprosy and other biomedical research. *Int J Lepr other Mycobact Dis Off organ Int Lepr Assoc*. 1971;39(3):703-714.
41. Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int J Lepr other Mycobact Dis Off organ Int Lepr Assoc*. 1971;39(3):693-702.
42. Storrs EE, Walsh GP, Burchfield HP, Binford CH. Leprosy in the armadillo: new model for biomedical research. *Science*. 1974;183(4127):851-852. doi:10.1126/science.183.4127.851
43. Opromolla D V, de Arruda OS, Fleury RN. [Maintenance of armadillos in captivity and results of the inoculation of *Mycobacterium leprae*]. *Hansenol Int*. 1980;5(1):28-36.
44. MURRAY JG, SPOONER ET, WALKER J. Experimental infection of mice with *Madurella mycetomi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1960;54:335-341. doi:10.1016/0035-9203(60)90114-0
45. Mahgoub ES. Experimental infection of athymic nude New Zealand mice, nu nu strain with mycetoma agents. *Sabouraudia*. 1978;16(3):211-216. doi:10.1080/00362177885380281
46. Zlotnik H, Buckley HR. Experimental production of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect Immun*. 1980;29(3):1141-1145. doi:10.1128/iai.29.3.1141-1145.1980
47. Beaman BL, Scates SM. Role of L-forms of *Nocardia caviae* in the development of chronic mycetomas in normal and immunodeficient murine models. *Infect Immun*. 1981;33(3):893-907. doi:10.1128/iai.33.3.893-907.1981
48. Conde C, Melendro EI, Fresán M, Ortiz-Ortiz L. *Nocardia brasiliensis*: mycetoma induction and growth cycle. *Infect Immun*. 1982;38(3):1291-1295. doi:10.1128/iai.38.3.1291-1295.1982

49. van de Sande WWJ, van Vianen W, ten Kate M, Fahal A, Bakker-Woudenberg I. Amphotericin B but not itraconazole is able to prevent grain formation in experimental *Madurella mycetomatis* mycetoma in mice. *Br J Dermatol*. 2015;173(6):1561-1562. doi:10.1111/bjd.14025
50. Cavanagh LL. Attempts to induce mycetoma in monkeys and mice using *Madurella mycetomi*. *Sabouraudia*. 1974;12(2):258-262. doi:10.1080/00362177485380331
51. Beaman BL, Sugar AM. Nocardia in naturally acquired and experimental infections in animals. *J Hyg (Lond)*. 1983;91(3):393-419. doi:10.1017/s0022172400060447
52. Kloezen W, van Helvert-van Poppel M, Fahal AH, van de Sande WWJ. A *Madurella mycetomatis* Grain Model in *Galleria mellonella* Larvae. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(7):e0003926. doi:10.1371/journal.pntd.0003926
53. Rosas-Taraco AG, Perez-Liñan AR, Bocanegra-Ibarias P, Perez-Rivera LI, Salinas-Carmona MC. Nocardia brasiliensis induces an immunosuppressive microenvironment that favors chronic infection in BALB/c mice. *Infect Immun*. 2012;80(7):2493-2499. doi:10.1128/IAI.06307-11
54. Meester I, Rosas-Taraco AG, Salinas-Carmona MC. Nocardia brasiliensis induces formation of foamy macrophages and dendritic cells in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2014;9(6):e100064. doi:10.1371/journal.pone.0100064
55. Salinas-Carmona MC, Rosas-Taraco AG, Welsh O. Systemic increased immune response to Nocardia brasiliensis co-exists with local immunosuppressive microenvironment. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2012;102(3):473-480. doi:10.1007/s10482-012-9779-y
56. Trevino-Villarreal JH, Vera-Cabrera L, Valero-Guillén PL, Salinas-Carmona MC. Nocardia brasiliensis cell wall lipids modulate macrophage and dendritic responses that favor development of experimental actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect Immun*. 2012;80(10):3587-3601. doi:10.1128/IAI.00446-12
57. Chacon-Moreno BE, Welsh O, Cavazos-Rocha N, et al. Efficacy of ciprofloxacin and moxifloxacin against Nocardia brasiliensis in vitro and in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(1):295-297. doi:10.1128/AAC.01023-08
58. Gomez-Flores A, Welsh O, Said-Fernández S, Lozano-Garza G, Tavarez-Alejandro RE, Vera-Cabrera L. In vitro and in vivo activities of antimicrobials against Nocardia brasiliensis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(3):832-837. doi:10.1128/AAC.48.3.832-837.2004
59. Millán-Chiu BE, Hernández-Hernández F, Pérez-Torres A, Méndez-Tovar LJ, López-Martínez R. In situ TLR2 and TLR4 expression in a murine model of mycetoma caused by Nocardia brasiliensis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;61(3):278-287. doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00775.x
60. González-Ochoa A. [Experimental production of mycetoma by Nocardia braziliensis in the mouse]. *Gac Med Mex*. 1969;99(8):773-781.
61. Salinas-Carmona MC, Torres-López E. Role of passive humoral immunity in experimental mycetoma by Nocardia brasiliensis. *Ann N Y Acad Sci*. 1996;797:263-265. doi:10.1111/j.1749-6632.1996.tb52972.x

62. Salinas-Carmona MC, Torres-Lopez E, Ramos AI, Licon-Trillo A, Gonzalez-Spencer D. Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect Immun*. 1999;67(5):2428-2432. doi:10.1128/IAI.67.5.2428-2432.1999
63. Almaguer-Chávez JA, Welsh O, Lozano-Garza HG, et al. Decrease of virulence for BALB/c mice produced by continuous subculturing of *Nocardia brasiliensis*. *BMC Infect Dis*. 2011;11:290. doi:10.1186/1471-2334-11-290
64. Gonzalez-Carrillo C, Millan-Sauceda C, Lozano-Garza HG, et al. Genomic Changes Associated with the Loss of *Nocardia brasiliensis* Virulence in Mice after 200 In Vitro Passages. Camilli A, ed. *Infect Immun*. 2016;84(9):2595-2606. doi:10.1128/IAI.00329-16
65. García-Lozano JA, García-Berlanga CC, Viveros-Rosado RT, Ocampo-Candiani J, Vargas-Villarreal J, Vera-Cabrera L. A novel experimental immunomodulatory therapy against *Nocardia brasiliensis* in a BALB/c murine model. *Clin Exp Dermatol*. 2020;45(5):544-548. doi:10.1111/ced.14139
66. Segeritz C-P, Vallier L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. Jalali M, Saldanha FYL, Jalali M, eds. *Basic Sci Methods Clin Res*. Published online 2017:151-172. doi:10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6
67. Oettinger T, Jørgensen M, Ladefoged A, Hasløv K, Andersen P. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tuber lung Dis Off J Int Union against Tuberc Lung Dis*. 1999;79(4):243-250. doi:10.1054/tuld.1999.0206
68. Germanier R, Fürer E. Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J Infect Dis*. 1975;131(5):553-558. doi:10.1093/infdis/131.5.553
69. van Loon FP, Clemens JD, Chakraborty J, et al. Field trial of inactivated oral cholera vaccines in Bangladesh: results from 5 years of follow-up. *Vaccine*. 1996;14(2):162-166. doi:10.1016/0264-410x(95)00122-h
70. Espinoza-González NA, Welsh O, De Torres NW, et al. Efficacy of DA-7218, a new oxazolidinone prodrug, in the treatment of experimental actinomycetoma produced by *Nocardia brasiliensis*. *Molecules*. 2008;13(1):31-40. doi:10.3390/molecules13010031

13.0 RESUMEN ANTIBIOGRÁFICO

Dr. Luis Angel Yamallel Ortega

Candidato para el grado de Especialidad en Dermatología

Tesis: Efecto de la inmunización con cepa atenuada más tedizolid en el micetoma experimental por *Nocardia brasiliensis*

Campo de Estudio: Ciencias de la salud

Biografía: Nací en Monterrey, Nuevo León; el 26 de julio de 1994. Mis padres son Luis Angel Yamallel Saucedo y Perla Leticia Ortega Loyola, ambos médicos de profesión. Según mi mamá, era un martes, 8:30 am. Nací en el área de Pensionistas del Hospital Universitario, porque parece que este hospital estaba destinado a tenerme entre sus dedos desde mi concepción. Aunque nací aquí, crecí y pasé gran parte de mi infancia en Saltillo, Coahuila.

Realicé mis estudios de preparatoria en el Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, en Saltillo; y mi carrera de medicina en la Universidad Autónoma de Nuevo León.

De mi padre y de mis profesores nació mi cariño a la dermatología.

Como la cirugía dermatológica, disfruto de otras cosas que ocupan tanto mis manos como mi mente; como la cocina, los videojuegos y la escritura.