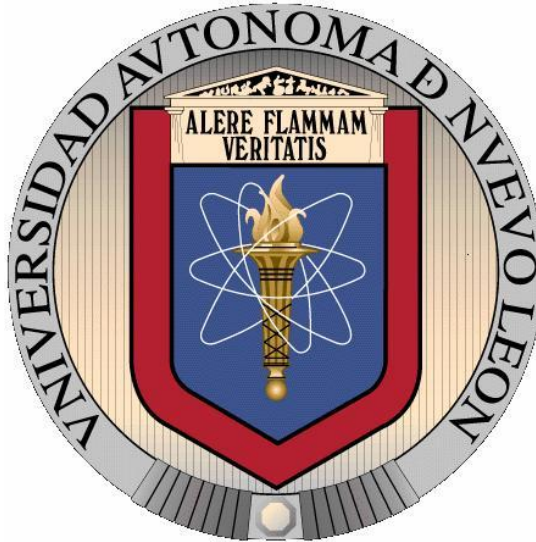


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
HOSPITAL UNIVERSITARIO “Dr. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ”
SERVICIO DE DERMATOLOGÍA



“Terapia del Micetoma Experimental por *Nocardia brasiliensis* en Ratones BALB/c
con Quinolonas y Oxazolidinonas de Reciente Desarrollo”

Por

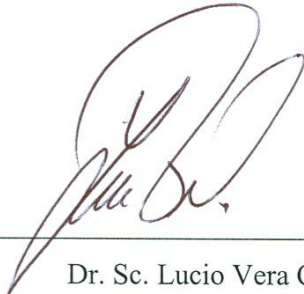
MCP Alejandra Daw Garza

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

Marzo 2012

“Terapia del Micetoma Experimental por *Nocardia brasiliensis*
en Ratones BALB/c con Quinolonas y Oxazolidinonas
de Reciente Desarrollo”

Aprobación de Tesis:



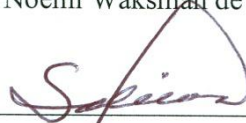
Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera
Director de Tesis



Dr. Med. Oliverio Welsh Lozano
Co-Director de Tesis



Dra. Sc. Noemí Waksman de Torres



Dr. Sc. Mario César Salinas Carmona



Dr. Med. José Carlos Jaime Pérez

Dr. Med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Sub-Director de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera, asesor de mi tesis, un gran maestro, además al Dr. Med. Oliverio Welsh Lozano, co-asesor de mi tesis, a la Dra. Sc. Noemí Waksman de Torres, al Dr. Sc. Mario César Salinas Carmona y al Dr. Med. José Carlos Jaime Pérez, por formar parte del comité de tesis, por su valioso apoyo y sugerencias en la revisión de este trabajo. Al Dr. Jorge Ocampo Candiani, Dra. Minerva Gómez Flores por sus valiosas sugerencias durante el desarrollo de este trabajo, y por su apoyo como maestros.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Servicio de Dermatología del Hospital Universitario por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS, en especial al MVZ Gerardo Lozano Garza por su invaluable apoyo durante el desarrollo de este trabajo y al Dr. Med. Carlos de la Garza por su apoyo en el uso de sus instalaciones en el Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina.

A mi esposo, Roberto, por su comprensión y apoyo durante estos años de trabajo. A mis padres Dalia y Salvador, por su orientación, por desvelarse y madrugar conmigo durante mi etapa de estudiante y por compartir mi pasión por la medicina. A mis hermanas Dalia y Mónica, por acompañarme y ayudarme en la realización de este trabajo. Muy en especial a mi abuelo Salvador, de quien heredé la vocación, mi abuelo Abel por su motivación y a mis abuelas Esther y Francisca.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. EPIDEMIOLOGÍA	2
3. PATOGENIA	4
4. TRATAMIENTO.	7
5. IMPORTANCIA	13
6. ORIGINALIDAD.	14
7. JUSTIFICACIÓN	15
8. HIPÓTESIS	16
9. OBJETIVO GENERAL	17
10. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
11. MATERIALES Y MÉTODOS.	19
11.1 Determinación de las concentraciones plasmáticas de los antimicrobianos	19
11.1.1 Preparación de los antimicrobianos	20
11.1.2 Cuantificación de las concentraciones plasmáticas por HPLC	21
11.2 Desarrollo de micetoma en ratones	22
11.2.1 Preparación del inóculo de <i>N. brasiliensis</i>	22
11.2.2 Infección experimental	23
11.2.3 Ensayos terapéuticos	23

12. RESULTADOS	25
12.1 Concentraciones plasmáticas de los antimicrobianos	25
12.1.1 Concentraciones plasmáticas de garenoxacino	25
12.1.2 Concentraciones plasmáticas de gatifloxacino	26
12.1.3 Concentraciones plasmáticas de Linezolid	27
12.1.4 Concentraciones plasmáticas de DA-7867	28
12.2 Terapia experimental <i>in vivo</i>	31
12.2.1 Primer ensayo terapéutico	31
12.2.2 Segundo ensayo terapéutico	35
12.2.3 Tercer ensayo terapéutico	39
13. DISCUSIÓN	43
14. CONCLUSIONES	48
15. REFERENCIAS	49

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Análisis de varianza de ANOVA del primer ensayo terapéutico	33
II.	Análisis de varianza ANOVA del segundo ensayo terapéutico.	37
III.	Análisis de varianza ANOVA del tercer ensayo terapéutico.	41

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Medición de lesiones de micetoma en ratones	24
2. Concentraciones en plasma de garenoxacino	25
3. Concentraciones en plasma de gatifloxacino	26
4. Concentraciones en plasma de linezolid	28
5. Concentraciones en plasma de DA-7867	29
6. Concentraciones en plasma de DA-7867 en agua para beber	30
7. Efecto de linezolid, gatifloxacino y DA-7867 sobre el desarrollo de lesiones experimentales por <i>N. brasiliensis</i>	32
8. Prueba de dunnet del primer ensayo terapéutico	34
9. Efecto de linezolid y linezolid con gatifloxacino sobre el desarrollo de lesiones experimentales por <i>N. brasiliensis</i>	36
10. Prueba de dunnet del segundo ensayo terapéutico	38
11. Efecto de DA-7867 subcutáneo y DA-7867 en agua para beber sobre el desarrollo de lesiones experimentales por <i>N. brasiliensis</i>	40
12. Prueba de dunnet del tercer ensayo terapéutico	42

NOMENCLATURA

CMI	Concentración mínima inhibitoria
DDS	Diamino – difenil – sulfona
TMP/SXT	Trimetoprim sulfametoxazol
mRNA	RNA mensajero
<i>cMax</i>	Concentración máxima
DNA	Acido desoxirribonucleico
RNA	Acido ribonucleico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
PEG	Polietilenglicol
BHI	Infusión cerebro corazón
RPM	Revoluciones por minuto
ANOVA	Análisis de varianza
F	Distribución F de fischer
<i>P</i>	Probabilidad
μ L	Microlitros
mg	Miligramos
L	Litro
Kg	Kilogramo

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

El micetoma es una infección subcutánea crónica, de etiología múltiple, causada por hongos verdaderos (eumicetoma) o por actinomicetos aeróbicos (actinomicetoma); se observa en países tropicales y sub-tropicales (1). Los actinomicetales productores de micetoma se agrupan en tres géneros con diferentes especies: *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia asteroides*, *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri* y *Streptomyces somaliensis* (2). Los agentes causales del eumicetoma son, entre otros, *Madurella mycetomatis*, *Madurella grisea* y *Pseudallescheria boydii* (1).

La enfermedad fue descrita por primera vez por Gill en el año de 1842, en un distrito de la India llamado Madura, de ahí los términos maduromicetoma y los géneros *Madurella* y *Actinomadura* (3).

El micetoma es una infección que afecta al tejido subcutáneo y ocurre tras la penetración transcutánea del agente etiológico en sus formas infectantes a través de heridas y áreas de traumatismo.

Se caracteriza por una tumefacción de la región anatómica afectada, y una deformidad de la misma, así como la producción de abscesos y fístulas, las cuales drenan una secreción purulenta que contiene al agente causal (4).

CAPITULO 2

EPIDEMIOLOGÍA

Actualmente esta enfermedad se encuentra distribuida a nivel mundial con predominio en zonas tropicales. La enfermedad es más común en India, México, Arabia Saudita, Venezuela, Yemen y un área en “cinturón” de África que se extiende desde Senegal, en la costa oeste, atraviesa Mali, Nigeria, Congo y Sudán hasta Somalia en la costa este (4).

Otros países con alta endemicidad son: India y Senegal para eumicetomas y México, Centro y Sudamérica, para actinomicetoma (5).

A nivel mundial, alrededor del 60% de los casos de micetoma son de origen actinomicético y alrededor del 40% de origen micótico (5).

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 (5).

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 (5).

En una encuesta realizada en nuestro país para determinar la incidencia del micetoma en México, se obtuvo información de un total de 2015 casos de micetoma en un período de 30 años (1956-1985) con una incidencia promedio de 70 casos anuales. De los 2015 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, Morelos y Guerrero (6).

En nuestro hospital, en la tesis del MCP Humberto Cantú (7), se realizó la estadística de enero de 1990 a diciembre de 2003 en 101 casos de micetoma que se trataron en el Servicio de Dermatología. En promedio se reportaron 8 pacientes anuales. 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. 20% de los pacientes provenían de SLP y 13% de Tamaulipas. El 25% restante provenían de Zacatecas, Jalisco, Veracruz e Hidalgo (7).

CAPITULO 3

PATOGENIA

Esta enfermedad ocurre tras la penetración en la piel del agente etiológico (pies descalzos o manos) en áreas traumatizadas o con heridas (5). 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, y pueden diseminarse (dependiendo de su localización) por la cavidad torácica, la abdominal o por otras regiones del cuerpo. Así mismo, pueden causar deformaciones de las partes afectadas, así como también pérdida de su función. Estas infecciones, de manera ocasional, pueden llegar a ser fatales (8).

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 (5).

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.

La afección ósea depende de la virulencia del organismo infectante y la respuesta inmune del hospedero (16). 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.

Los microorganismos causales se localizan en los abscesos que histológicamente 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 (5).

El micetoma predomina en hombres entre 20-40 años de edad, y es más común en granjeros y trabajadores de áreas rurales, quienes se encuentran expuestos a sufrir heridas penetrantes con madera, piedras y/o astillas (16).

Los sitios anatómicos más frecuentemente afectados son miembros inferiores y tronco, pero se puede encontrar en cualquier región del cuerpo (16).

Los mecanismos de infección de los agentes causales del actinomicetoma han sido estudiados utilizando modelos animales tanto murino como modelo en rata (9, 10, 11, 12, 13).

González-Ochoa y cols. (26), fueron los primeros en desarrollar micetoma experimental en ratones por *N. brasiliensis* observando la formación de granos al inocular la bacteria de manera intraperitoneal. Macotella-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 (14).

En 1969, González-Ochoa produjo micetomas experimentales con éxito en el cojinete plantar de ratones, lo cual representa la vía de entrada de *Nocardia brasiliensis* al tejido humano (11).

Más adelante, Salinas, y cols. desarrollaron micetoma experimental en ratones BALB/c, cultivando en agar cerebro-corazón una suspensión unicelular conteniendo 10^7 UFC por ml. Se inyectaron alícuotas de la suspensión en solución salina en cojinete plantar de los ratones (15).

Vera-Cabrera y cols. desarrollaron micetomas experimentales por *N. brasiliensis* en ratas, las cuales desarrollaron lesiones, pero a los 20 días comenzaron a tener curación sin aplicación de tratamiento alguno, a diferencia del ratón, en los cuales puede desarrollarse una infección crónica. Por lo cual se concluyó que el sistema inmune de las ratas es más eficiente para resolver esta infección (13).

CAPITULO 4

TRATAMIENTO

El tratamiento de los actinomicetomas está basado en agentes antimicrobianos y en los eumicetomas se basa en antifúngicos y tratamiento quirúrgico (17).

Con respecto a los actinomicetomas, se han empleado en su terapéutica diversos antimicrobianos, entre ellos las sulfonamidas (DDS, sulfametoxipiridazina y sulfadoxina), isoniacida, minociclina, imipenem, estreptomicina, rifampicina, tetraciclinas, amoxicilina/ácido clavulánico y trimetoprim/sulfametoxazol (17). Este último se utiliza en el tratamiento para los casos de micetoma no complicados y pequeños. La tasa más alta de curación con este régimen de tratamiento es del 70% (TMP/SXT 8 y 40 mg/kg/día) (17,18). Hay pacientes que no responden a esta terapia, y en esos casos está indicada la combinación con otros antimicrobianos (23). Las principales reacciones adversas a las sulfas son trastornos gastrointestinales, dermatitis reaccionales y anemia, leucopenia, etc. (18).

La respuesta terapéutica puede incrementarse al agregar diaminodifenilsulfona durante 1 mes al esquema de TMP/SXT (27). En los casos que no responden a TMP/SXT, puede utilizarse amoxicilina-ácido clavulánico 1.5 gr/día durante 6 meses (18).

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. La amikacina es un aminoglucósido que tiene efectos colaterales principalmente a nivel renal y auditivo (17). 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 (27). Aunque la disfunción renal es reversible, la hipoacusia puede no serlo (27).

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 (18). Con esta terapia se obtuvo una tasa de curación del 95% en una serie de 52 casos de micetoma (18). En caso de resistencia a la amikacina puede utilizarse netilmicina.

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.

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. La actividad de las drogas se confirmó por el método de microdilución en caldo (21).

Las oxazolidinonas son antimicrobianos de reciente desarrollo, fueron descubiertas por Du Pont Pharmaceuticals en los 80's, pero sus primeros análogos (DuP 105 y DuP 721) no pudieron ser sintetizadas como fármacos. Upjohn reinició la investigación en los 90s, llegando a la síntesis de linezolid y eperezolid (60).

Las oxazolidinonas son inhibidores de la síntesis de proteínas (67); se unen a la subunidad 50S ribosomal, previniendo la formación del complejo de iniciación de la síntesis proteica, evitando la traducción del mRNA (62) en un sitio en el que no compite con otros antimicrobianos (59). Rara vez se ha reportado desarrollo de resistencia a estos compuestos (28,59). Tienen actividad *in vitro* contra *S. aureus*, *S. pneumoniae* resistente a penicilina y enterococos multi-drogo resistentes (67,70).

Las oxazolidinonas han mostrado actividad en modelo murino de infecciones sistémicas causadas por estos organismos (68).

El primer compuesto aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos es linezolid (63), el cual ha mostrado actividad inhibitoria *in vitro* contra bacterias gram positivas, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, incluyendo cepas multiresistentes, con CMI₅₀ ente 0.5 y 4 µg/mL (64,69).

Además, muestra actividad inhibitoria contra varias actinobacterias gram positivas, incluyendo *Nocardia*, *Actinomadura* y *M. tuberculosis* (22,29,30,44). El linezolid ha sido el primer antimicrobiano con actividad ante todas las especies de *Nocardia*, (45) incluyendo especies resistentes, tales como *N. farcinica* y *N. transvalensis* (45).

Linezolid es eficaz al ser administrado tanto por vía intravenosa como por vía oral; técnicamente se clasifica como bacteriostático contra un buen número de patógenos *in vitro*, pero *in vivo* se comporta como un antimicrobiano bactericida (61).

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 contra 25 cepas de *Nocardia brasiliensis* aisladas de pacientes con micetoma (20). En este estudio todas las cepas probadas fueron sensibles a linezolid (CMI₉₀ 2 µg/ml y CMI₅₀ 1µg/ml), con efectividad comparable a la de amikacina (CMI₉₀ 4 µg/ml y CMI₅₀ 2 µg/ml), amoxicilina - ácido clavulánico (CMI₉₀ 4 µg/ml y CMI₅₀ 2 µg/ml) y TMP/SXT (CMI₉₀ 9.5/0.5 µg/ml CMI₅₀ 9.5/0.5 µg/ml) (20).

Posteriormente, se probó la actividad de linezolid, amoxicilina - ácido clavulánico y amikacina en un modelo de micetoma experimental en ratones BALB/c, observándose la actividad más alta con linezolid, seguida por amoxicilina - ácido clavulánico y amikacina. (21)

Linezolid ha sido utilizado con éxito en el manejo de abscesos cerebrales por *N. farcinica* en receptores pediátricos de trasplante renal (47) y ha sido probado eficazmente en un paciente de nuestro servicio de Dermatología con nocardiosis subcutánea por *Nocardia transvaliensis* asociada con linfopenia CD4+ idiopática, con abscesos metastáticos, el cual fue resistente a sulfas, aminoglucósidos y quinolonas. Se le administró linezolid v/o, 600 mg/día por 3 meses, obteniendo su curación total (18).

Cuando linezolid es aplicado por largos períodos de tiempo puede causar efectos adversos, tales como mielosupresión y neuropatía periférica (31). Por tal motivo hemos buscado otras oxazolidinonas más potentes y con una menor toxicidad, debido a que el micetoma es una infección crónica y los tratamientos largos.

El DA-7867 (S) – [N-3-(4-[2-(1-metil-5-tetrazoil)- piridin - 5 - il] – 3 – fluorofenil) 2 – oxo – 5 – oxazolidinil] metil-acetamida), es una oxazolidinona experimental, el cual es más activo que linezolid contra microorganismos gram positivos y gram negativos.(46) Tiene una alta actividad inhibitoria *in vitro* contra *Nocardia brasiliensis* a concentraciones menores que linezolid; esto hace a DA-7867 una excelente candidata a ser probada *in vivo* (22) .

Por otro lado, las quinolonas son un grupo de antimicrobianos con poca o nula actividad *in vitro* contra *Nocardia brasiliensis*. En contraste, las quinolonas de más reciente desarrollo, tales como gatifloxacino, moxifloxacino y garenoxacino han mostrado una alta actividad inhibitoria *in vitro* ante este microorganismo, mostrando valores de CMI similares a aquéllas presentadas por amikacina y linezolid (22).

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. (52, 53) Los parámetros farmacocinéticos en humanos de estas nuevas fluoroquinolonas son más favorables (mayores áreas bajo la curva, *C_{max}* y vida media) que aquéllos del ciprofloxacino. (54, 55,56,72).

Gatifloxacino es una 8-metoxi-fluoroquinolona (72), que inhibe la DNA girasa y la topoisomerasa IV. Tiene una potente actividad inhibitoria contra *N. brasiliensis in vitro*, (22) además de un amplio espectro de patógenos susceptibles tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*.(72) Gatifloxacino tiene eficacia probada *in vitro* e *in vivo* contra *M. tuberculosis* (71), organismo filogenéticamente similar a *N. brasiliensis*, por lo cual su eficacia podría ser comparable.

Garenoxacino es una des-fluoroquinolona con actividad contra patógenos gram positivos y gram negativos, aerobios y anaerobios. Es la quinolona con mayor actividad *in vitro* contra *N. brasiliensis*. (48)

Por lo dicho anteriormente, es importante confirmar la actividad de estas quinolonas en la infección por *Nocardia brasiliensis* en un modelo animal antes de considerar su utilización en humanos.

CAPITULO 5

IMPORTANCIA

El actinomicetoma es una enfermedad endémica en nuestro país, y debido a la resistencia o falta de efectividad de los antimicrobianos empleados y toxicidad secundaria, es importante evaluar la actividad de otros antimicrobianos que puedan funcionar como alternativas en el tratamiento del micetoma por *Nocardia brasiliensis*.

CAPITULO 6

ORIGINALIDAD

Hasta la fecha no se conoce el efecto *in vivo* de DA-7867, gatifloxacino, y garenoxacino en modelos experimentales de actinomicetoma.

CAPITULO 7

JUSTIFICACIÓN

Los efectos de los antimicrobianos *in vitro* pueden no suceder *in vivo*, ya que las condiciones del medio comparados con la de los tejidos son muy diferentes. Las drogas pueden ser inactivadas, metabolizadas a otros compuestos o al contrario, ser bioquímicamente cambiadas a componentes activos. Es por esto importante corroborar los hallazgos observados *in vitro* con un medio experimental *in vivo* antes de probar las drogas en humanos. Para ello utilizaremos un modelo de micetoma experimental en ratones BALB/c.

CAPITULO 8

HIPÓTESIS

Nocardia brasiliensis es sensible *in vivo* a DA-7867, garenoxacino y gatifloxacino.

CAPITULO 9

OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficacia de nuevas terapias con DA-7867, gatifloxacino y garenoxacino contra *N. brasiliensis*, en un modelo experimental *in vivo* en ratones BALB/c.

CAPITULO 10

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los niveles plasmáticos de linezolid, gatifloxacino, garenoxacino y DA-7867 en ratones BALB/c.
2. Realizar terapia experimental *in vivo* en ratones BALB/c previamente infectados con *N. brasiliensis* con linezolid, gatifloxacino, garenoxacino y DA-7867, además de linezolid en combinación con gatifloxacino.

CAPITULO 11

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trata de un estudio experimental *in vitro* e *in vivo* prospectivo, longitudinal.

11.1. Determinación de las concentraciones plasmáticas de los antimicrobianos

El DA-7867 nos fue proporcionado por Dong-A Pharm (Korea); linezolid nos fue proporcionado por sus fabricantes (Pharmacia and Upjohn, Kalamazoo, Mich); garenoxacino y gatifloxacino fueron adquiridos de Bristol-Myers Squibb (Princeton, N.J.).

Se determinaron las concentraciones en plasma de linezolid, gatifloxacino, garenoxacino y DA-7867 en ratones BALB/c, con el fin de observar los picos plasmáticos y así determinar la posología que sería utilizada al momento de realizar los ensayos terapéuticos. Para ello se utilizaron 3 dosis de cada antimicrobiano. Las dosis de linezolid probadas fueron 10 mg/kg, 25 mg/kg y 50 mg/kg, basada su elección en estudios previos *in vivo* realizados por Gómez-Flores y cols. (21)

Las dosis de DA-7867 fueron 5 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg y 50 mg/kg, basados en estudios previos en ratones con otras bacterias y de farmacocinética del mismo en ratas (25). Las dosis de garenoxacino fueron de 25 mg/kg, 50 mg/kg y 75 mg/kg.

Las dosis de gatifloxacino fueron 50 mg/kg, 75 mg/kg y 100 mg/kg, seleccionadas en base a un estudio previo de farmacocinética y farmacodinámica en modelo murino infectado con *S. aureus* y *S. pneumoniae* (24).

Debido a que en el ser humano la terapia administrada vía oral es más práctica, se decidió probar en uno de nuestros ensayos terapéuticos DA-7867 por vía oral. Se optó por diluir la droga en el agua para beber; se calculó la cantidad de droga de acuerdo a la cantidad de agua ingerida por cada ratón al día, ajustando una dosis de DA-7867 de 25 mg/kg. Debido a que la cantidad de antimicrobiano ingerido no puede calcularse exactamente, se determinaron los niveles en plasma en los animales por HPLC a los 0min, 3hr, 6hr, 9hr y 12hr después de haber comenzado a ingerir de una nueva botella de agua con la droga en cuestión, y de esta manera se determinó si las concentraciones alcanzadas por vía oral fueron comparables con la droga administrada por vía subcutánea.

11.1.1. Preparación de los antimicrobianos para ser administrados a los animales

DA-7867: se diluyó la sustancia pura en 1 ml de dimetilsulfóxido (Productos Químicos Monterrey) + 1 ml de agua inyectable + 2 ml de PEG 400 (Sigma®).

DA-7867 vía oral: fue suspendido en hidroxipropilmetilcelulosa al 10% (Sigma®) y administrada a una dosis de 25 mg/kg en el agua de beber.

Gatifloxacino: La sustancia obtenida de la fuente comercial fue liofilizada para concentrarla y ajustarla a la dosis usada en los ratones.

Linezolid: La sustancia pura fue pesada y diluida en solución salina.

Garenoxacino: Fue diluido en solución salina.

Se trabajó 1 dosis por sesión, inyectándose de forma subcutánea en el dorso de cada ratón la misma dosis (excepto en 3 ratones, para el tiempo 0). Se tomaron muestras de sangre (500 μ L) del seno infraorbitario de cada ratón, a los 0 min, 20 min, 40 min, 60 min, 120 min, 240 min, 360 min, 420 min, 540 min y 600 min. A los animales tratados por vía oral, se les dio en el agua de beber la droga en cuestión y se midieron los niveles en plasma a los 0min, 3hr, 6hr, 9hr y 12hr después de que comenzaran a ingerir de una nueva botella de agua. Por cada tiempo se tomaron muestras a 3 ratones, formando un total de 27 ratones, los cuales se sacrificaron posteriormente con éter. La sangre se centrifugó en microcentrífuga y se separó el plasma, el cual se congeló a -70° C.

11.1.2 Cuantificación de las concentraciones plasmáticas por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución). (40)

La proteína sérica se precipitó combinando 50 μ L de muestra con 150 μ L de acetonitrilo.

La mezcla fue vortexeada por 10 segundos y centrifugada por 5 minutos a 5304xg, y el sobrenadante fue filtrado por filtros de nylon de 0.45 μ m (Waters).

Los filtrados se vertieron en viales de 150 μ L para su análisis cromatográfico.

La separación cromatográfica de los antimicrobianos se obtuvo utilizando un cromatógrafo líquido Waters 2690 Alliance con detector de diodo 996 (DAD) y detector de fluorescencia 474.

Se utilizó una columna Atlantis dC18 de 150 mm x 4.6 mm I.D., con una partícula de 5 µm (Waters). La temperatura de la columna se mantuvo a 30°C.

Las muestras fueron eluidas con una fase móvil, la cual consiste de ácido tricloroacético al 0.1% (solvente A) y acetonitrilo (solvente B); se utilizó un programa de gradiente para la elución. En el caso de DA-7867, el programa fue modificado con un aumento en la proporción inicial de acetonitrilo, con la finalidad de reducir el tiempo de retención de la droga.

La tasa de flujo de la fase móvil fue de 1.0 mL/min y el volumen de inyección fue de 10 µL. La longitud de onda determinada por DAD para linezolid fue de 254 nm. Para DA-7867, garenoxacino y gatifloxacino, las intensidades de fluorescencia fueron medidas a una longitud de onda de excitación de 292 nm y a una emisión de longitud de onda de 408 nm.

11.2 Desarrollo de micetoma en ratones

Para la producción experimental del micetoma en los ratones BALB/c se siguió el método desarrollado por González-Ochoa y cols. (11) modificado por Gómez-Flores y cols. (21)

11.2.1. Preparación del inóculo

Se preparó el inóculo de *Nocardia brasiliensis* cepa HU-JEG-1, la cual fue cultivada en caldo BHI (Brain-Heart-Infusion) a una temperatura de 37°C en agitación continua a 110 RPM por 72 horas. Se separó la masa bacteriana por centrifugación, y se lavó 4 veces con solución salina.

Posteriormente se maceró en un tubo de Potter-Evelham, se dejó sedimentar la suspensión y la masa bacteriana se lavó una vez más con solución salina y se ajustó el inóculo a un peso neto de 20 mg de *N. brasiliensis* por 50 µL de solución salina.

11.2.2 Infección experimental

Se inocularon ratones hembra de la cepa BALB/c de 8 a 12 semanas de edad, mediante la inyección en el cojinete plantar derecho de 20 mg de peso húmedo de *Nocardia brasiliensis*, de forma subcutánea. Se hicieron revisiones semanales durante 1 mes para comprobar la eficacia del inóculo para producir la infección. Una vez probada, se inoculó al grupo que conformaría cada ensayo y una semana después de la inoculación se inició cada terapia.

11.2.3. Ensayos terapéuticos

Basados en los resultados del objetivo número 1, se seleccionaron los antimicrobianos que permanecieron un intervalo de tiempo mayor por encima del CMI para *Nocardia brasiliensis*.

Siete días después de la inoculación de *N. brasiliensis* en el cojinete plantar derecho de cada ratón, se dividieron en grupos de 15 animales cada uno y se inició la administración de los antimicrobianos que alcanzaron las concentraciones plasmáticas más altas a una sola concentración, durante un período de 4 semanas.

Los medicamentos se aplicaron a nivel del dorso del animal, vía subcutánea. Un grupo actuó como control, aplicándosele únicamente solución salina libre de pirógenos.

Al grupo tratado por vía oral se le administró la droga en el agua para beber, la cual se cambiaba cada 24hr. La respuesta terapéutica se evaluó clasificando las lesiones de 0 a 4+ en el grupo control (ver figura 1), al cual le fue aplicada únicamente solución salina y se comparó el efecto del tratamiento que fue evaluado en cuanto a la inhibición de la producción de lesiones. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de ANOVA.

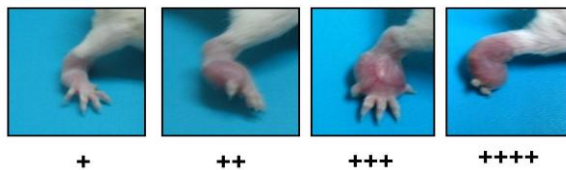


Figura 1. Medición de lesiones. Las lesiones en las patas de los ratones se basaron en el grado de extensión, en una escala de 0 (representa ausencia de lesiones) hasta 4 cruces en el caso de que la inflamación sea severa y se extienda por encima del metatarso. (21)

CAPITULO 12

RESULTADOS

12.1 Determinación de las concentraciones plasmáticas de garenoxacino, gatifloxacino, linezolid y DA-7867.

12.1.1. Garenoxacino

Tomando en cuenta que la CMI de garenoxacino ante *N. brasiliensis* HUJEG-1 fue 0.5 µg/ml, podemos observar (ver figura 2) que a concentraciones de 25 y 50 mg/kg la droga no logra rebasar la CMI y a una concentración de 75 mg/kg sí se consigue rebasarla, pero no por más de 4 horas.

Por estas razones se decidió eliminar garenoxacino de la segunda parte del estudio.

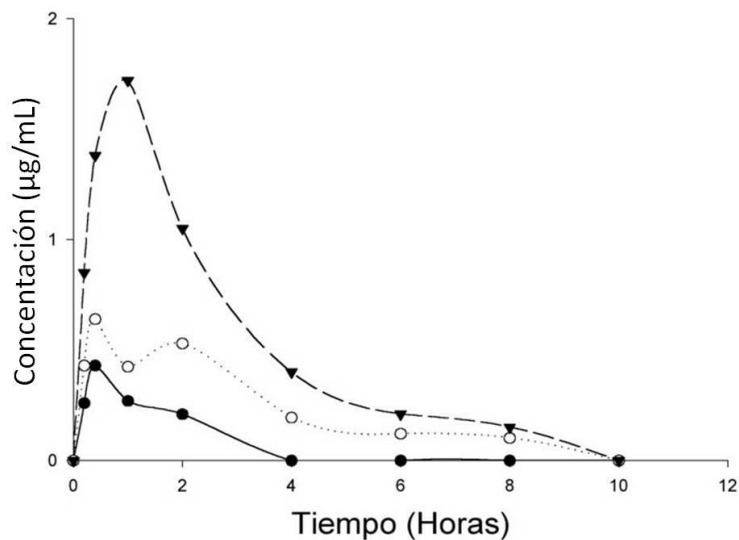


Figura 2. Concentraciones en plasma de garenoxacino. Se inyectó garenoxacino por vía subcutánea a 25 (●), 50 (○) y 75 (▼) mg/kg. Cada punto representa la media de las cuantificaciones en plasma de 3 animales.

12.1.2. Gatifloxacino

Esta droga sí se mantuvo por encima del CMI para *Nocardia* (2 µg/ml) en las tres dosis probadas (ver figura 3). A su mayor dosis de 100 mg/kg logró mantenerse en plasma alrededor de 8 horas, por lo cual se decidió dosificarla cada 8 horas para los ensayos terapéuticos.

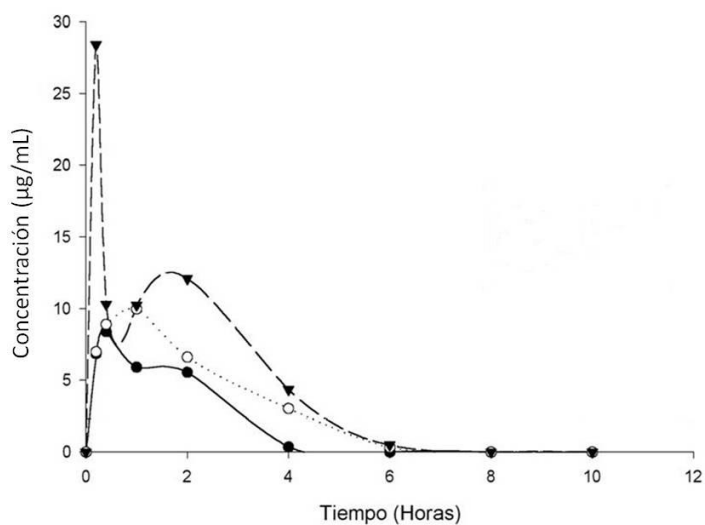


Figura 3. Concentraciones en plasma de gatifloxacino. Se inyectó gatifloxacino por vía subcutánea a 50 (●), 75 (○) y 100 (▼) mg/kg. Cada punto representa la media de las cuantificaciones en plasma de 3 animales.

12.1.3 Linezolid

Esta droga logró alcanzar altos niveles en plasma hasta de 70 µg/ml y se mantuvo por encima de la CMI de *N. brasiliensis* (0.12 µg/ml) por más de 6 horas en su dosis más alta (50 mg/kg) y a 25 mg/kg se mantuvo por encima de la CMI por más de 4 horas y alcanzó una *Cmax* de 50 µg/ml. Se decidió inocular la droga cada 8 horas. (ver figura 4)

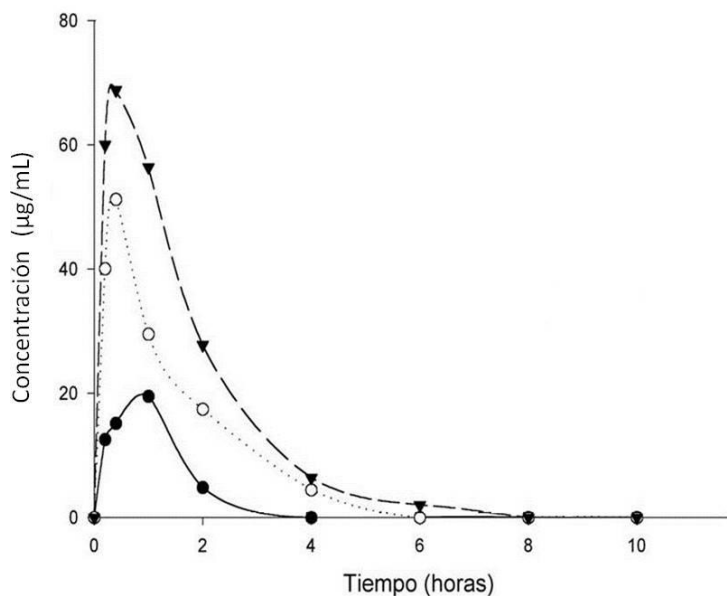


Figura 4. Concentraciones en plasma de linezolid. Se inyectó linezolid por vía subcutánea a 10 (●), 25 (○) y 50 (▼) mg/kg. Cada punto representa la media de las cuantificaciones en plasma de 3 animales.

Linezolid mantuvo niveles plasmáticos altos a sus tres dosis, por encima de la CMI para *Nocardia* durante aproximadamente 8 horas a 25 y 50 mg/kg.

12.1.4 DA-7867

Este medicamento alcanzó niveles plasmáticos por encima de la CMI de *Nocardia brasiliensis* (0.03 µg/ml) incluso tras 10 horas de haber sido administrada a dosis de 10 y de 25 mg/kg, con una C_{max} de 200 µg/ml a dosis de 25 mg/kg. (ver figura 4). A 50 mg/kg alcanza una C_{max} de 500 µg/kg. (ver figura 5) Esta droga puede administrarse cada 24 horas en los ensayos terapéuticos.

Los niveles plasmáticos encontrados en ratas fueron distintos, según reportes de Bae, et al. (35).

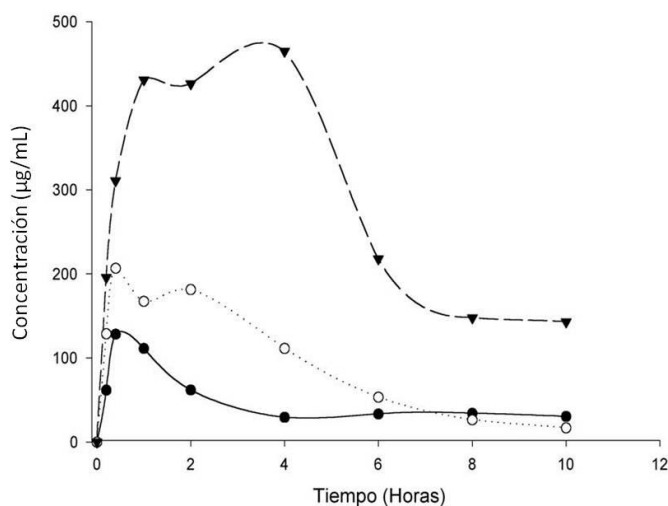


Figura 5. Concentraciones en plasma de DA-7867. Se inyectó DA-7867 por vía subcutánea a 10 (●), 25 (○) y 50 (▼) mg/kg. Cada punto representa la media de las cuantificaciones en plasma de 3 animales.

Por vía subcutánea, DA-7867 rebasó la CMI para *Nocardia* durante las 10 horas en que fue probada, aún a 10 mg/kg.

Las concentraciones en plasma de DA-7867 en agua para beber alcanzaron niveles por encima de la CMI las 12 horas, con una C_{max} de 2.8 µg/ml, 3 horas después de empezar a beber, por lo cual se puede administrar 1 botella al día para el grupo que participe en los ensayos terapéuticos. (ver Figura 6).

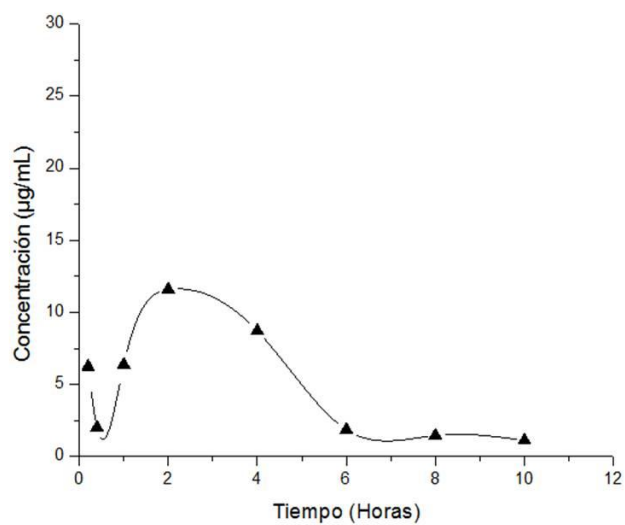


Figura 6. Concentraciones en plasma de DA-7867 en el agua para beber. Se administró DA-7867 en el agua para beber a 25 (▼) mg/kg. Cada punto representa la media de las cuantificaciones en plasma de 3 animales.

Por esta vía DA-7867 logró rebasar la CMI para *Nocardia* (0.03 µg/ml) durante más de 10 horas.

12.2 Terapia experimental *in vivo* en ratones BALB/c infectados con *Nocardia brasiliensis*

12.2.1 Primer ensayo terapéutico

En nuestro primer ensayo terapéutico, fueron utilizadas las 3 drogas seleccionadas, las cuales, después de haber sido observadas sus concentraciones en plasma, han sido linezolid, gatifloxacino y DA-7867 además de un grupo control. Se dividieron los ratones hembra BALB/c en 4 grupos, de 15 ratones cada uno:

Grupo 1: Control: fueron administrados 100 μ L de solución salina cada 8 horas vía subcutánea a nivel del lomo.

Grupo 2: Gatifloxacino 100 mg/kg (250 μ L) fue administrado cada 8 horas.

Grupo 3: Linezolid 25 mg/kg (350 μ L) fue administrado vía subcutánea cada 8 horas.

Grupo 4: DA-7867 10 mg/kg (100 μ L) fue administrada cada 24 horas vía subcutánea.

Tras 4 semanas de tratamiento diario 5 días de la semana, se procedió a medir las patas inoculadas con *N. brasiliensis* en cuanto a inhibición de producción de lesiones de micetoma (ver Figura 7.)

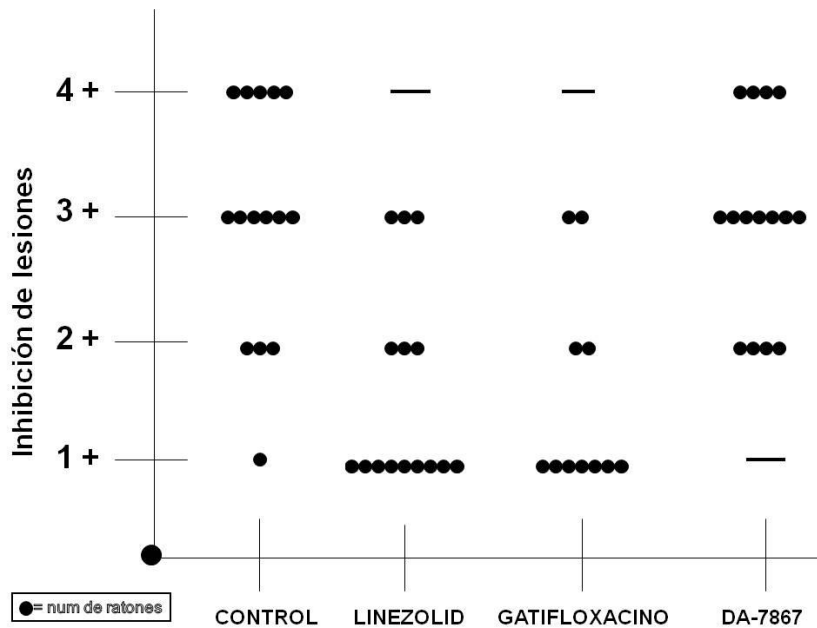


Figura 7. Efecto de la aplicación de linezolid a 25 mg/kg, gatifloxacino a 100 mg/kg y DA-7867 a 10 mg/kg sobre el desarrollo de lesiones experimentales por *N. brasiliensis*. Cada punto representa a un ratón, y se agruparon según el grado de inhibición de lesiones. Hubo diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.0001$) entre los grupos tratados con linezolid o gatifloxacino, y el grupo control.

El segundo y tercer grupo (linezolid y gatifloxacino) mostraron un mayor grado de inhibición de lesiones con un mayor número de ratones midiendo entre 1 y 2 cruces. DA-7867 se comporta muy similar al grupo control, tratado sólo con solución salina.

Se utilizó la prueba de varianza de ANOVA de comparación de grupos (ver TABLA I) para valorar el efecto de varios medicamentos antimicrobianos (variables independientes) en la infección experimental por *Nocardia brasiliensis* (variable dependiente) y así valorar su eficacia en ratones infectados, comparados con un grupo control, el cual fue inyectado con solución salina únicamente.

TABLA I

Análisis de Varianza de ANOVA.

FUENTE	DF	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
TRATAMIENTO	3	28.3	9.41	13.47	<0.0001
ERROR	52	36.33	0.70		
TOTAL	55	64.55			

La P menor a 0.0001 muestra una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados y el grupo control.

La hipótesis que se pone a prueba en el ANOVA de un factor es que las medias poblacionales son iguales. Si son iguales significa que los grupos no difieren en la variable dependiente y en consecuencia, la variable independiente es por tanto independiente de la variable dependiente.

Para poner a prueba la hipótesis de igualdad de medias se obtiene un estadístico llamado F , que refleja el grado de parecido existente entre las medias que se están comparando. Cuanto más diferentes sean las medias, mayor será el valor de F .

El cociente entre las dos medias cuadráticas proporciona el valor de F , el cual determina si se rechaza o no la hipótesis de igualdad (la cual establece que las medias son iguales). En esta prueba la hipótesis de igualdad fue rechazada, lo cual significa que las medias de los grupos comparados difieren entre sí, y con un valor de P <0.0001 se concluye que la diferencia es estadísticamente significativa. (Tabla 2.)

Para saber qué media difiere de cuál otra debemos realizar un *post hoc* de comparaciones múltiples, en este caso la prueba de DUNNET, la cual sirve para comparar cada grupo con un grupo control. Por tanto, controla la tasa de error para $k - 1$ comparaciones. Por defecto, se considera que la última categoría del factor es la que define el grupo control, pero puede seleccionarse la primera categoría. Permite efectuar tanto contrastes bilaterales como unilaterales. (Ver Figura 8).

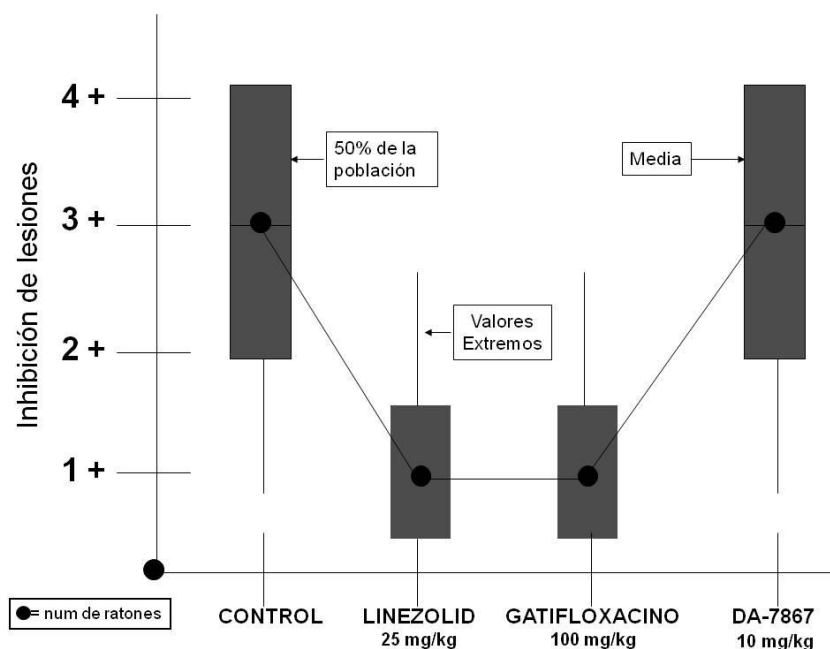


Figura 8. Prueba de DUNNET. Comparación de la media de cada grupo con la del grupo control. Gatifloxacino y linezolid son las que muestran una diferencia con la media del control ($P < 0.0001$).

En esta prueba podemos comparar la media de cada grupo con la del grupo control. Las que muestran la diferencia son la media del grupo de linezolid y la del grupo de gatifloxacino, ya que la media de DA-7867 es similar a la del grupo control.

Conclusiones del primer ensayo:

1. Los grupos de linezolid y gatifloxacino lograron inhibir el desarrollo de lesiones de micetoma en este estudio, por lo cual, en el siguiente ensayo se decidió probarlos en combinación y observar si existe sinergismo *in vivo*.
2. DA-7867 a 10 mg/kg de peso no tiene un efecto en la evolución de lesiones de micetoma, haciéndola indistinguible del grupo control, en el siguiente estudio pudiera probarse a 25 mg/kg.

12.2.2. Segundo ensayo terapéutico

En este ensayo terapéutico, fue utilizado gatifloxacino subcutáneo comparado con la combinación gatifloxacino/linezolid a 50 mg/kg y 25 mg/kg respectivamente, por la misma vía y fueron comparados con un grupo control. Los ratones hembra BALB/c fueron divididos en 4 grupos, de 15 ratones cada uno:

Grupo 1: Control, 100 µL de solución salina, fue inyectado vía subcutánea cada 8 horas.

Grupo 2: Gatifloxacino en combinación con linezolid a 50 mg/kg y 25 mg/kg, respectivamente, fue inoculado vía subcutánea cada 8 horas.

Grupo 3: Gatifloxacino fue administrado a una dosis de 50 mg/kg cada 8 horas, vía subcutánea.

Tras 4 semanas de tratamiento, 5 días por semana, se procedió a medir las patas inoculadas con *N. brasiliensis* en cuanto a inhibición de producción de lesiones de micetoma (ver Figura 9).

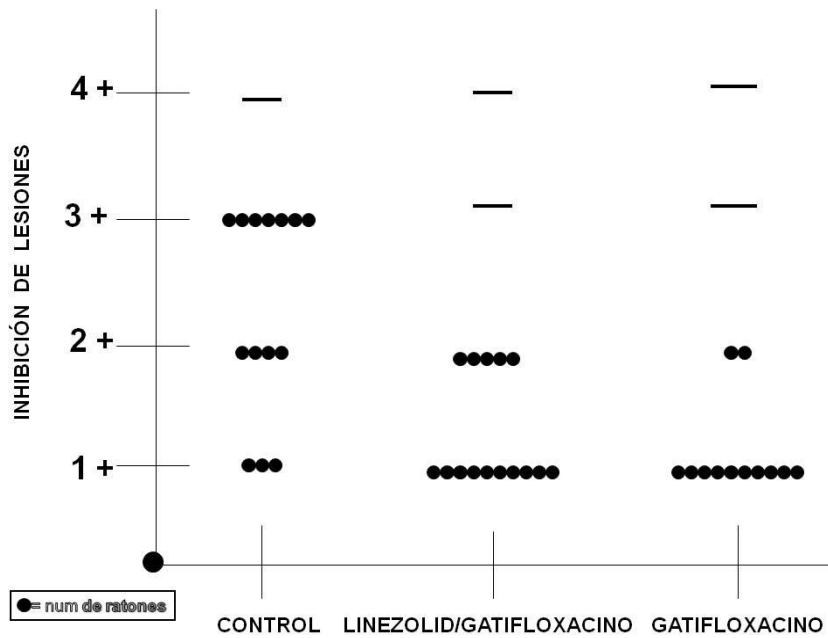


Figura 9. Efecto de la aplicación de linezolid/gatifloxacin a 25 mg/kg y 50 mg/kg y de gatifloxacin a 50 mg/kg sobre el desarrollo de lesiones experimentales por *N. brasiliensis*. Cada punto representa a un ratón, los cuales se agruparon según el grado de inhibición de lesiones. Hubo diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.0001$) entre los grupos tratados con gatifloxacin y linezolid/gatifloxacin, y el grupo control.

Se puede observar diferencia entre el grupo control y el grupo de gatifloxacin administrado solo y en combinación con linezolid, manteniéndose las lesiones entre 1 y 2 cruces.

La prueba de ANOVA muestra una F que rechaza la hipótesis de igualdad y concluimos que las medias de los grupos tratados son distintas y la $P < 0.0001$ demuestra que es de una forma estadísticamente significativa (ver Tabla II).

TABLA II.

Prueba de Varianza de ANOVA

FUENTE	DF	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
TRATAMIENTO	2	20.038	10.019	10.93	<0.0001
ERROR	38	34.840	0.917		
TOTAL	40	54.878			

Esta prueba arroja una $P < 0.0001$, lo cual demuestra una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados y el grupo control.

La prueba de DUNNET se utilizó para comparar las medias de los grupos tratados con la del control (ver Figura 10).

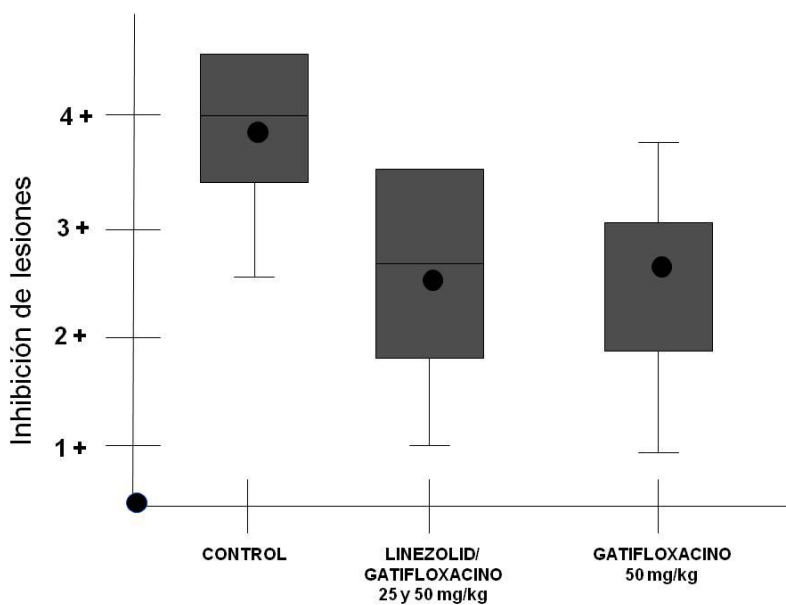


Figura 10. Prueba de DUNNET del segundo ensayo terapéutico. Se observa diferencia entre las medias de linezolid/gatifloxacino y gatifloxacino con la del grupo control ($P < 0.0001$).

En este análisis observamos una diferencia entre la media del grupo combinando linezolid y gatifloxacino y del control, al igual que la media del grupo de gatifloxacino contra la del control.

Conclusiones del segundo ensayo terapéutico:

1. En este ensayo fue probada la actividad *in vivo* de gatifloxacino a 50 mg/kg, con la cual también se obtuvo inhibición de lesiones de micetoma, y en este caso se pudo considerar igual de efectiva que la dosis de 100 mg/kg y tuvo menor riesgo de toxicidad.
2. En cuanto a aplicar gatifloxacino y linezolid en combinación, fue posible observar que los resultados fueron muy similares al administrar cada antimicrobiano por separado.

12.2.3. Tercer ensayo terapéutico

Para la realización de este ensayo terapéutico, en el cual fue probada la actividad de DA-7867 administrada tanto por vía oral como por vía subcutánea, comparadas con un grupo control; para lo cual los ratones hembra BALB/c fueron divididos en 4 grupos, de 15 ratones cada uno:

Grupo 1: Control 100 μ L fueron administrados vía subcutánea cada 24 horas.

Grupo 2: DA-7867 fue administrado a dosis de 25 mg/kg vía oral cada 24 horas.

Grupo 3: DA-7867 fue administrado vía subcutánea a dosis de 25 mg/kg cada 24 horas.

Tras 4 semanas de tratamiento, 5 días por semana, se obtuvieron los siguientes resultados (ver Figura 11).

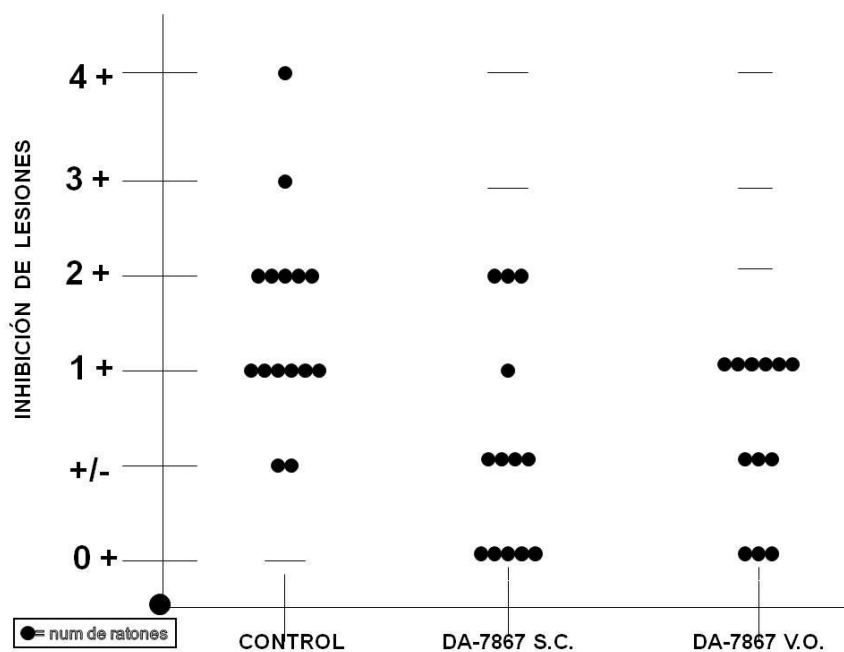


Figura 11. Efecto de la aplicación subcutánea y vía oral de DA-7867 a 25 mg/kg. Cada punto representa a un ratón, y se agruparon según el grado de inhibición de lesiones. Hubo diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.002$) entre los grupos tratados con DA-7867 v.o. y s.c. y el grupo control.

DA-7867 logró mantener las lesiones de micetoma entre 0 y 1 cruces administrado por vía oral, y entre 0 y 2 cruces vía subcutánea.

Se realizó la prueba de varianza de ANOVA de comparación de grupos (ver Tabla 3). Muestra una P de 0.002, la cual es estadísticamente significativa y refirió una diferencia entre el grupo control y los grupos tratados con DA-7867.

TABLA III.

Prueba de Varianza de ANOVA

FUENTE	DF	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
TRATAMIENTO	2	16.72	8.36	7.42	0.002
ERROR	37	41.68	1.13		
TOTAL	39	54.40			

Se rechazó la hipótesis de igualdad, y con una P de 0.002 se determinó que la diferencia entre los grupos fue estadísticamente significativa; se realizó un análisis de DUNNET para comparar las medias de los grupos entre sí. (Tabla III.)

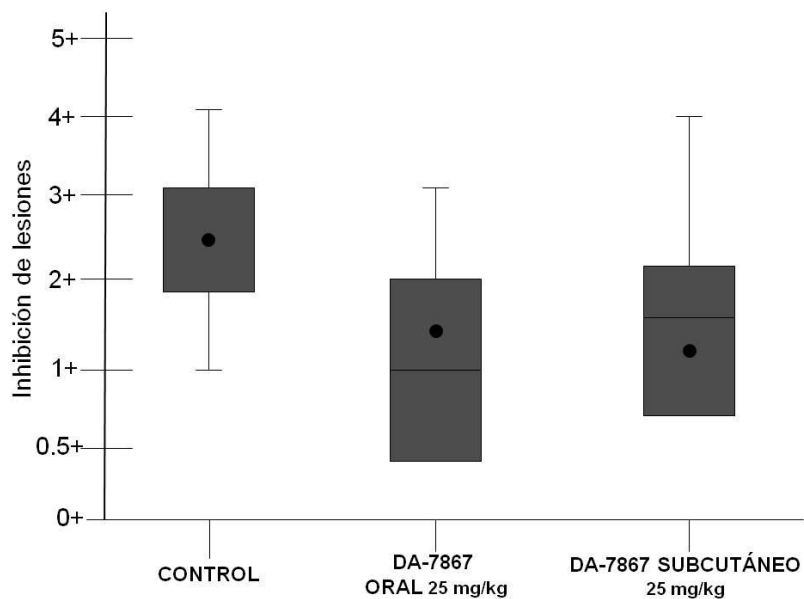


Figura 12. Prueba de DUNNET. Tercer ensayo terapéutico. Las medias de los grupos tratados con DA-7867 mostraron diferencia al ser comparadas con la media del grupo control ($P = 0.002$).

La comparación entre las medias de los grupos mostró diferencia entre la media de DA-7867 tanto vía oral como vía subcutánea al ser comparadas con la del grupo control.

Conclusiones del tercer ensayo:

De este ensayo podemos concluir que DA-7867 mostró eficacia al inhibir lesiones de micetoma a una dosis de 25 mg/kg, a diferencia del primer ensayo en el cual se probó a una dosis más baja (10 mg/kg) y no solamente fue eficaz al ser administrado por vía subcutánea, sino también al ser probado en agua para beber.

CAPÍTULO 13

DISCUSIÓN

En la actualidad no existen muchas alternativas para el tratamiento del actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*. Los más comúnmente utilizados, trimetoprim-sulfametoxazol y su combinación con amikacina no son 100% efectivos y se sabe que producen efectos adversos tales como síndrome de Stevens- Johnson, hipoacusia y/o neurotoxicidad.

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

Debemos tomar en cuenta la posible variación al probar estas drogas en humanos, debido a que los medicamentos pudieran eliminarse más rápido o lento del torrente sanguíneo en estos últimos.

Las fluoroquinolonas han sido utilizadas exitosamente en el tratamiento de infecciones causadas por micobacterias (42). Diferentes quinolonas, tales como ciprofloxacino han mostrado eficacia en infecciones por actinomicetos aeróbicos, como *Nocardia asteroides* y micobacterias (38,43).

A pesar de que las quinolonas han sido utilizadas eficazmente en el tratamiento de algunas infecciones por *Nocardia spp.* (22,34), no han sido utilizadas en la terapéutica de infecciones causadas por *N. brasiliensis*.

Las nuevas quinolonas, tales como garenoxacino, moxifloxacino y gatifloxacino tienen alta actividad *in vitro* contra *N. brasiliensis*. (22) Basados en esta premisa, gatifloxacino fue seleccionado en nuestro estudio para probar su actividad *in vivo*, y fue posible observar una actividad comparable con la ya probada actividad de linezolid. (10)

Los resultados que presentamos en este estudio por tanto demuestran un importante efecto *in vivo* de gatifloxacino contra *Nocardia brasiliensis*, presentándolo como una alternativa futura para el tratamiento de actinomicetoma en humanos.

En nuestro laboratorio han sido utilizadas otras quinolonas con CMI similares a gatifloxacino, tales como moxifloxacino, la cual ha probado tener efectos inhibitorios *in vivo* en terapia experimental de micetoma por *N. brasiliensis*. (36)

Al término del segundo ensayo terapéutico gatifloxacino desafortunadamente se retiró del mercado por efectos adversos reportados, como aumento en el riesgo de disglucemia en pacientes de la tercera edad (32,37). Su regreso a la industria farmacéutica puede depender de nuevos estudios clínicos en pacientes con tuberculosis, en los cuales tiene una actividad muy similar al etambutol (33). En tal caso, se seleccionarían sólo pacientes jóvenes no diabéticos como candidatos a tratamiento con esta fluoroquinolona.

Linezolid ha sido utilizado eficazmente en el tratamiento de algunos casos de nocardiosis subcutánea. (41) Después de varios meses de tratamiento han aparecido efectos adversos tanto neurológicos y hematológicos en algunos de estos pacientes. (31)

En nuestra experiencia, tratamos a un paciente quien presentaba nocardiosis subcutánea de la pierna, con diseminación hacia abdomen y formación de grandes abscesos retroperitoneales. (18) La infección se produjo por una cepa clínicamente resistente a amikacina, SXT y amoxicilina-ácido clavulánico; fue eficazmente tratado con linezolid a dosis de 600mg cada 24 horas por un período de 3 meses. Esto nos alentó a investigar nuevas drogas para casos resistentes de actinomicetoma.

En estudios previos *in vitro* observamos que cepas de *Nocardia spp.* y *Actinomadura madurae* han mostrado ser susceptibles a antimicrobianos que no habían sido utilizados en pacientes con micetoma, incluyendo nuevas oxazolidinonas como DA-7867. (28)

DA-7867 tiene una mayor actividad *in vitro* que linezolid y amikacina; por ello fue seleccionada para nuestro estudio.

En este estudio se observó que linezolid a dosis de 50 mg/kg permanece en el plasma de ratones BALB/c por aproximadamente 4 horas sobre la CMI para *Nocardia*, con una *Cmax* de 70 µg/ml. Cuando se administra en humanos por vía oral la cantidad de 600 mg cada 12 horas, linezolid alcanza una *Cmax* de 21.2 µg/ml con una vida media de 5.4 horas. (45) DA-7867 alcanza concentraciones mucho más altas en plasma de ratón con una *Cmax* de 200 µg/ml a una dosis de 25 mg/kg, manteniendo niveles encima de la CMI (0.03 µg/ml) por más de 10 horas. Por estos altos niveles alcanzados en plasma decidimos utilizar DA-7867 a una dosis baja 10 mg/kg y únicamente una vez al día; no se observó diferencia clínica con esta dosis comparada con el grupo control.

Cuando probamos una dosis más alta (25 mg/kg), pudimos observar efectividad terapéutica, comparable con aquella de linezolid, siendo éste último administrado cada 8 horas. Esto puede deberse a la exquisita susceptibilidad de *N. brasiliensis* a esta droga (CMI 0.03 µg/ml), comparada con 0.12 µg/ml de linezolid.

En el ensayo en el cual fue administrada DA-7867 a los ratones en el agua para beber a una dosis calculada de 25 mg/kg, aún sin poder controlar del todo la cantidad total de la droga ingerida por cada ratón, pudimos observar un efecto comparable al de DA-7867 administrada por vía subcutánea. Es importante recalcar que la condición de los animales tratados por vía oral era excelente, comparada con la manipulación a la que fueron sometidos aquéllos que fueron tratados con inyección subcutánea varias veces al día.

Estos resultados abren la posibilidad de administrar DA-7867 por vía oral como alternativa a la vía subcutánea, lo cual sería más cómodo para el paciente. Esto es importante, ya que el apego al tratamiento es esencial para lograr esquemas terapéuticos exitosos a largo plazo. Otra posibilidad es impregnar inicialmente al paciente con el medicamento vía subcutánea o intravenosa y posteriormente mantenerse por vía oral, como se lleva a cabo con distintos antimicrobianos en la actualidad en pacientes humanos.

Uno de los factores más importantes que determinan el uso de drogas experimentales en humanos es su pobre solubilidad en agua (50). Dong-A-Pharm ha desarrollado una pro-droga, DA-7218, una nueva oxazolidinona, la cual se defosforila en el cuerpo en su componente activo: DA-7157.

La presencia del radical fosfato en DA-7218 incrementa grandemente su solubilidad comparada con la del compuesto activo DA-7157. Esto facilita su aplicación en animales, debido a que la solubilidad es un factor importante en el análisis de nuevos compuestos *in vivo*, que no pueden probarse en modelos animales por su pobre solubilidad en agua.

En nuestra institución se ha probado su eficacia en micetoma experimental, (39) y representa otra alternativa terapéutica para la terapia del micetoma resistente a la terapia estándar. (39)

En un futuro pueden desarrollarse esquemas terapéuticos en ciclos, tal como el que combina amikacina intramuscular por tres semanas y TMP/SXT por cinco semanas, y así disminuir el tiempo de uso de sustancias como las oxazolidinonas, ya que linezolid al ser utilizado de manera crónica pudiera desarrollar efectos adversos.

En este estudio probamos la combinación de linezolid y gatifloxacino y el resultado fue muy similar al obtenido con gatifloxacino solo. Otra posibilidad sería realizar ensayos terapéuticos combinando linezolid y TMP/SXT en ciclos o DA-7867 y TMP/SXT, previamente probando sinergismo *in vitro*.

La terapia del actinomicetoma es difícil, no existen muchas alternativas, además de no ser 100% eficaz. En este estudio pudo demostrarse la eficacia *in vivo* de gatifloxacino y el compuesto DA-7867 comparados con linezolid, medicamento con eficacia ya probada *in vivo* y en humanos. La cuantificación de los niveles plasmáticos de estos medicamentos nos ayudaron a elegir adecuadamente la posología a utilizar. Se corrobora además la utilidad del modelo experimental de micetoma en ratones BALB/c.

CAPITULO 14

CONCLUSIONES

1. En este estudio pudo demostrarse la eficacia *in vivo* de gatifloxacino y el compuesto DA-7867 comparados con linezolid.
2. Pudo probarse que actividad inhibitoria de DA-7867 por vía oral en el micetoma experimental es comparable con la de DA-7867 administrado por vía subcutánea.
3. La cuantificación de los niveles plasmáticos de estos medicamentos nos ayudaron a elegir adecuadamente la posología a utilizar.
4. Se corroboró además la utilidad del modelo experimental de micetoma en ratones BALB/c.

CAPÍTULO 15

REFERENCIAS

1. López, R. Micología Médica. México. Trillas. 1ª Edición p. 59. (1995).
2. Tight, R.R., Bartett, M.S. Actinomycetoma in the United States. Rev. Infect. Dis. 3: 1139-1150. (1981).
3. Gill. Indian Army Medical Reports. London: Churchill. (1874).
4. Bonifaz, A. Micología Médica Básica. 1ª Ed. 10: 135-136. (1990).
5. Arenas, R. Micología Médica Ilustrada. México. 2ª Ed. 113-116; 125-132. (2003).
6. López, M.R. Epidemiology of mycetoma in Mexico: study of 2105 cases. Gac. Med. Mex. 128(4):477-81. (1992).
7. Cantú, G.H. Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con micetoma en la consulta de dermatología del H.U., período enero 1990 a diciembre 2003. Tesis de especialidad en dermatología en el Hospital Universitario "Dr. Jose E. Gonzalez". (2004).
8. Serrano, J.A., Sandoval, A.A. El micetoma, revisión. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 23: 70-79. (2003) .
9. Beaman, B.L., Sugar, A.M. *Nocardia* in naturally acquired and experimental infection in animals. J. Hyg. Can. 1983; 91: 393-419. (1983).
10. 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).
11. González-Ochoa, A. Producción experimental del micetoma por *Nocardia brasiliensis* en ratón. Gac. Med. Mex. 99:773-781. (1969).
12. 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).

13. Welsh-Lozano, O., Rodríguez, M.A., Salinas-Carmona, M.C. y Vera-Cabrera, L. Experimental mycetoma by *N. brasiliensis* in rats. *J. Mycol. Med.* 8:183-187. (1998).
14. Macotela-Ruiz, E. Sur la production de mycétomes expérimentaux par *Nocardia brasiliensis* et *Nocardia asteroides*. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1 : 46-54. (1963).
15. 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).
16. Lavalley A., et. al.. Micetomas por *Actinomadura madurae*. *Rev. Cent. Dermatol. Pascua.* 9:1. (2000).
17. Welsh, O. Mycetoma. Current concepts in treatment. *Int. J. of Dermatol.* 30:6. (1991).
18. Welsh, O., Gómez, M., Vera-Cabrera, L. Advances in the treatment of aerobic actinomycetes infections. (2003).
19. O. Welsh and L. Vera-Cabrera. Abstr. 15th Cong. Int. Soc. Hum. Antim. Mycol. Abstr. 354. (2003).
20. 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).
21. Gómez-Flores, A., Welsh, O. *In vitro* and *in vivo* activities of antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 832-837. (2004).
22. 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).
23. 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).
24. 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).

25. Soo, K..B. Pharmacokinetics of DA-7867, a new oxazolidinone, after intravenous or oral administration to rats: intestinal first pass effects. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 659-662. (2004).
26. 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).
27. Welsh, O., Salinas, M.C. Mycetoma. *Infectious Diseases.* Ed. Hoeprich 5th Edition. 1402 - 1406. (1994).
28. Bozdogan, B., Appelbaum, P.C. Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 23: 113-119. (2004).
29. 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).
30. Vera-Cabrera, L., Castro-Garza, J., Rendon, A., Ocampo-Candiani, J., Welsh, O., Choi, S.H., Blackwood, K., and Molina-Torres, C. *In vitro* susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates to garenoxacin and DA-7867. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 4351-4353. (2005).
31. Park, I.N., Hong, S.B., Oh, Y.M., Kim, M.N., Lim, C.M., Lee, S.D., Koh, Y., Kim, W.S., Kim, D.S., Kim, W.D., and Shim, T.S. Efficacy and tolerability of daily-half dose linezolid in patients with intractable multidrug-resistant tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 58: 701-704. (2006).
32. Park-Wyllie, L.Y., Juurlink, D.N., Kopp, A., Shah, B.R., Stukel, T.A., Stumpo, C., Dresser, L., Low, D.E., and Mamdani, M.M. Outpatient gatifloxacin therapy and dysglycemia in older adults. *N. Engl. J. Med.* 354: 1352-1361. (2006).
33. Rustomjee, R., Lienhardt, C., Kanyok, T., Davies, G.R., Levin, J., Mthiyane, T., Reddy, C., Sturum, A.W., Sirgel, F.A., Allen, J., Coleman, D.J., Fourie, B., and Mitchison, D.A. Gatifloxacin for TB (OFLOTUB) study team. A phase II study of the sterilizing activities of ofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 12: 128-138. (2008).
34. Tripodi, M.F., Adinolfi, L.E., Andreana, A., Sarnataro, G., Durante – Mangoni, E., Gambardella, M., Casillo, R., Farina, C., and Utili, R. Treatment of pulmonary nocardiosis in heart-transplant patients: importance of susceptibility studies. *Clin. Transplant.* 15: 415 – 420. (2001).

35. 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).
36. 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).
37. Yadav, V., Deopujari, K. Gatifloxacin and dysglycemia in older adults. *N. Engl. J. Med.* 354: 2725-2726. (2006).
38. Yew, W., Wong, P.C., Kwan, S.Y., Chan, C.Y., and Li, M.S. Two cases of *Nocardia asteroides* sternotomy infection treated with ofloxacin and a review of other active antimicrobial agents. *J. Infect.* 23: 297-302. (1991).
39. 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).
40. 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).
41. Moylett, E.H., Pacheco, S.E., Brown-Elliot, B.A., Perry, T.R., Buescher, E.S., Birmingham, M.C., Schentag, J.J., Gimbel, J.F., Apodaca, A., Schwartz, M.A., Rakita, R.M., and Wallace, R.J.Jr. Clinical experience with linezolid for the treatment of *Nocardia* infection. *Clin. Infect. Dis.* 36: 313-318. (2003).
42. Alangaden, GJ., Lerner, S.A. The clinical use of fluoroquinolones for the treatment of mycobacterial diseases. *Clin. Infect. Dis.* 25: 1213-1221. (1997).
43. 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).
44. Cynamon, M.H. Activities of several novel oxazolidinones against *M.tuberculosis*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 43:5. (1999).
45. Brown, B.A. *In vitro* activities of linezolid against multiple *Nocardia* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(4): 1295-1297. (2001).

46. Yong, D. *In vitro* activities of DA-7867 a novel oxazolidinone, against recent clinical isolates of aerobic and anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(1): 352 - 357. (2005).
47. Vigano, S.M., Edefonti, A., Ferrareso, M., Ranzi, M.L., and Grossi, P. Successful medical treatment of multiple brain abscesses due to *Nocardia farcinica* in a pediatric renal transplant recipient. *Pediatr. Nephrol.* 20(8): 1186-1188. (2005).
48. Fung-Tomc, J.C. Antibacterial spectrum of a novel des-fluoro quinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3351-3356. (2000).
49. Garlando, F., Bodmer, T., Lee, C., Zimmerli, W., and Pirovino, M. Successful treatment of disseminated nocardiosis complicated by cerebral abscess with ceftriaxone and amikacin: case report. *Clin. Infect. Dis.* 15:1039-1040. (1992).
50. Wallace, R.J., Steele, L.C., Sumpter, G., and Smith, J.M. Antimicrobial susceptibility patterns of *N. asteroides*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:1776-1779. (1980).
51. 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).
52. Andriole, V.T. The quinolones: prospects. In T Andriole (ed.), *The quinolones*, 2nd ed. Academic Press, Inc. San Diego, Calif. 417-429. (1998).
53. Bergan, T. Pharmacokinetics of the fluoroquinolones. *The quinolones*, 2nd ed. Academic Press, Inc. San Diego, Ca. 143-182. (1998).
54. Lubasch, A., Keller, I., Borner, K., Koeppe, P., and Lode, H. Comparative pharmacokinetics of ciprofloxacin, gatifloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, trovafloxacin and moxifloxacin after single oral administration in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2600-2603. (2000).
55. Borner, K., H. Lode, G. Höffken, P Koeppe, 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).
56. Chien, S. C., A.T. Chow, J. Natarajan, R. R. Williams, F.A. Wong, M.C. Rogge, and R.K. Nayak. Absence of age and gender effects on the pharmacokinetics of a single 500-milligram oral dose of levofloxacin in healthy subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1562-1565. (1997).

57. Peloquin C.A., D.J. Hadad, L.P. Molino, M. Palaci, W.H. Boom, R. Dietze, and J.L. Johnson. Population pharmacokinetics of levofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in adults with pulmonary tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:852-857. (2008).
58. 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).
59. Livermore, D.M. Linezolid *in vitro*: mechanism and antibacterial spectrum. *J. of Antimicrobial Chemotherapy.* 51:9-16. (2003).
60. Slee, A. M., Wuonola, M. A., McRipley, R. J., Zajac, I., Zawada, M. J., and Bartholomew, P. et al. Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: *in vitro* and *in vivo* activities of DuP105 and DuP 721. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1791–1797. (1987).
61. 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).
62. Swaney, S. M., Aoki, H., Ganoza, M. C. and Shinabarger, D. L. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 3251–5. (1998).
63. Barbachyn, M.R., Ford, C.W. Oxazolidinone structure-activity relationships leading to linezolid. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42:2010-23. (2003).
64. Curtis G., Gemmell* Susceptibility of a variety of clinical isolates to liezolid: a European inter-country comparison. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 48: 47-52. (2001).
65. Lin A.H., Murray R.W., Vidmar T.J., and Marotti K.R. The oxazolidinone eperzolid binds to the 50s ribosomal subunit and competes with binding of chloramphenicol and lincomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2127-2131. (1997).
66. Howard, M. R., Martin, I.J., Ackland, M.J., Sedlock, M.L., Anstadt, R.A., Barbachyn, M.R., Brickner, S.J., and D. K. Hutchinson. Preliminary pharmacokinetic and metabolic study of U-100480, a substituted oxazolidinone antibiotic, in the rat. In program and abstracts of the 35th interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy american society for microbiology, Washington, D.C. Abstr. F230, p. 153. (1995).

67. 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).
68. Ford, C.W., Hanel, J.C., Wilson, J.K, Moerman, D., Stapart, R.J., Yancey, Jr. Hutchinson K.K., Barbacyn, M.R., and Brickner, S.J. *In vivo* activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antimicrobial agents, against experimental bacterial infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:1508-1513. (1996).
69. Zurenko, G.E., Yagi, B.H, Schaadt, R.D., Allison, J.W., Killbum, J.O., Glickman S.E., and Hutchinson D.K., Barbachyn M.R., Brickner S.J. *In vitro* activities of U-100592 and U- 100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:839 – 845. (1996).
70. Jones, R.N., D.M. Johnson, and M.E. Erwin. *In vitro* antimicrobial activities and spectra of U-100592 and U- 100766, two novel fluorinated oxazolidinones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:720-726. (1996).
71. Alvarez-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).
72. Grasela, D. Clinical pharmacology of gatifloxacin, a new fluoroquinolone. *Clinical Infect. Dis.* 31: S51-58. (2000).
73. Blondeau, J.M. Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. *Clin. Ther.* 1: 3-40. (1999).