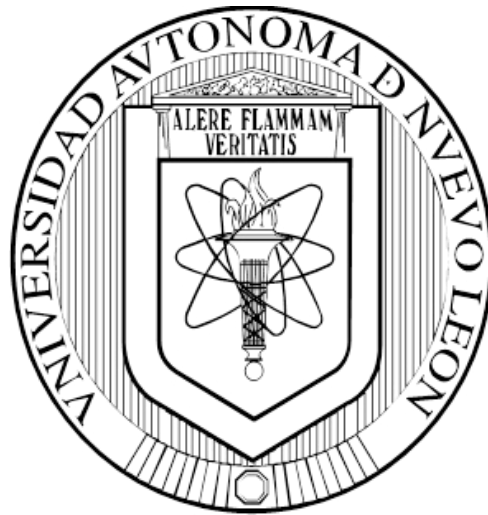


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA



EL PAPEL DE LA ANGIOGÉNESIS EN LA PATOGENIA DEL  
ACTINOMICETOMA POR *Nocardia brasiliensis*.

POR:  
FLORA EDUARDA CRUZ LÓPEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
INMUNOLOGÍA MÉDICA

JULIO 2015

**‘El papel de la angiogénesis en la patogenia del actinomicetoma por  
*Nocardia brasiliensis.*’**

**Aprobación de la Tesis:**

---

Dr. C. Mario César Salinas Carmona  
Director de tesis

---

Dra. C. Luz Isabel Pérez Rivera  
Miembro de la comisión

---

Dra. C. Anna Velia Vázquez Marmolejo  
Miembro de la comisión

---

Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado  
Subdirector de Estudios de Posgrado

‘El papel de la angiogénesis en la patogenia del actinomicetoma por  
*Nocardia brasiliensis.*’

Presentado por: Q. F. B. Flora Eduarda Cruz López.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Mario César Salinas Carmona.

El financiamiento para la realización de este trabajo fue otorgado por CONACYT (proyecto 165869, 2011) y PAICYT UANL (proyecto C5785-11, 2011).

Autorizado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario ‘José Eleuterio González’ bajo el número de registro IN12-003.

Director de tesis

---

Dr. C. Mario César Salinas Carmona

---

Dra. C. Luz Isabel Pérez Rivera

Miembro de la comisión

---

Dra. C. Anna Velia Vázquez Marmolejo

Miembro de la comisión

## **Dedicatoria**

A mis padres, un ejemplo de lucha y perseverancia en la vida,  
a quienes les debo todo lo que soy.

## Agradecimientos

Agradezco a la Facultad de Medicina y al Departamento de Inmunología por la oportunidad brindada para continuar con mis estudios. Al Dr. Mario César, por su compromiso con mi trabajo y su confianza, por la orientación y ayuda brindada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica por el apoyo financiero para realizar mis estudios de Posgrado.

A mis padres, por su cariño, dedicación y preocupación, sin ellos no podría haber salido adelante, por todo su apoyo y amor incondicional, y por creer en mí todo momento. No hubiese podido llegar hasta aquí sin ustedes. Mil gracias por todos sus sacrificios y cuidados, esto no ha sido en vano.

A Adrián Martínez Meléndez, mi mejor amigo, por su cariño, paciencia y consejos, por su ayuda profesional y emocional a lo largo de este tiempo, por ayudarme a superar las peores situaciones, por los momentos de risas y alegría, por todo lo que hemos vivido juntos y por lo que viene. Por su amistad incondicional, mil gracias.

A Christina González, por ser una guía en el departamento, por su apoyo y ayuda para que mi tesis saliera adelante, por sus palabras alentadoras expresadas en los mejores momentos y su amistad inagotable, gracias por estar siempre de mi lado. Nunca terminaré de agradecerle todo lo que hizo por mí.

A Armando Flores, por su compañerismo, comprensión y amistad, por su apoyo ante los retos enfrentados en estos dos años, mejor compañero de clases no he conocido antes, me da mucho gusto haber vivido esta experiencia a su lado.

A Heidi Ramírez y Minerva Uribe, por las tardes divertidas en el laboratorio y por compartir de su comida, por su amistad y sus muestras de cariño. Heidi, tus consejos siempre fueron acertados, muchas gracias por ayudarnos a sentirnos mejor aunque las cosas parecieran no tener solución.

A mis compañeros de generación, Irene, Nancy, Kevin, Elvis, Alejandro, Gustavo, Olivia, Lizbeth y Luis; a mis compañeras de clases Sonia, Saira y Daniela; y a mis nuevos compañeros David, Erick y Yesenia. Mi estancia no hubiese sido tan amena sin ustedes.

Al Dr. Yairh Limón por su ayuda en el desarrollo de esta tesis, a nivel personal y profesional. A Laura Salazar, por nunca negarme su ayuda con el manejo de mis ratones. Al Sr. Reynaldo Rodríguez Pecina por el cuidado de mis ratones y todas las atenciones brindadas. Al Dr. Esaú García Salinas, por su apoyo y guía en el análisis histopatológico.

Un agradecimiento especial a la Dra. Velia y a la Dra. Isabel, por sacarme adelante con los recursos que tuvieran al alcance de su mano, sus consejos, y la confianza que depositaron en mí, de principio a fin. A Brenda, Gloria, Emma, y Lupita, gracias por hacer tan llevadera mi estancia en el departamento, defenderme y ser tan amables conmigo. Al Dr. Ernesto Torres y al Dr. Adrián Rosas, por sus valiosos consejos, por escucharme, comprenderme y apoyarme. Al Dr. Juan Manuel Solís Soto, al Dr. Adolfo Soto, al M. C. Víktor Romero, al M.C.P. Juan Manuel Zavala, y a la T. Rosa Nelly Villa, involucrados de forma directa o indirecta con mi trabajo. A mis amigos Janeth, Héctor, Gaby y Carlos, todo su apoyo y cariño siempre estuvieron presentes.

Finalmente, quiero agradecer a todas aquellas personas que no pudieron ser mencionadas, quienes participaron a lo largo de este proyecto y cuyo desempeño fue esencial en este trabajo.

“Agradezco al miedo por permitirme percibir el peligro.

Y siendo que no habría cómo distinguir la mañana sin la noche, ni la sonrisa sin una lágrima, ni la vida sin la muerte, agradezco a todos estos sentimientos a los cuales todos hemos despreciado, pues no habría forma de entender el amor si no existiera el odio, ni comprenderíamos la importancia de la luz si la oscuridad no nos rodeara de vez en cuando.”

**Alexander Krebs.**

*Lo peor de cometer errores es no aprender de ellos.*

## Tabla de contenido

Capítulo	Página
<b>1. Introducción</b>	
1.1 Micetoma.	1
1.2 Agentes causales de micetoma.	2
1.3 Distribución geográfica.	3
1.4 <i>Nocardia brasiliensis</i> .	4
1.5 Taxonomía e identificación de <i>N. brasiliensis</i> .	6
1.6 Histopatología del actinomicetoma.	7
1.7 Tratamientos para pacientes con actinomicetoma.	9
1.8 Angiogénesis.	10
1.9 Factor de crecimiento de endotelio vascular.	14
1.10 Estructura de los vasos sanguíneos.	19
1.11 Linfangiogénesis.	20
1.12 Receptor endotelial de vasos linfáticos (LYVE-1).	22
1.13 Óxido nítrico.	23
1.13.1 Sintetasas de óxido nítrico endoteliales (eNOS).	24
1.14 Fibratos.	27
1.14.1 Fenofibrato.	28
1.14.2 Propiedades fisicoquímicas del fenofibrato.	29
1.14.3 Farmacología y mecanismo de acción del fenofibrato.	30
1.14.4 Fenofibrato y expresión de VEGF.	30
<b>2. Definición del problema y justificación</b>	32
<b>3. Hipótesis</b>	33
<b>4. Objetivos</b>	
4.1 Objetivo general.	34
4.2 Objetivos particulares.	34
<b>5. Material y métodos</b>	
5.1 Estrategia experimental.	35
5.2 Cepa de ratones BALB/c.	36
5.3 <i>N. brasiliensis</i> .	36
5.4 Modelo experimental de actinomicetoma.	36
5.5 Administración del tratamiento.	37
5.6 Evaluación clínica.	37
5.7 Sacrificio de animales.	38
5.8 Inmunohistoquímica.	38
5.8.1 Preparación de la muestra.	38
5.8.1.1 Deshidratación e inclusión del tejido en parafina.	39

5.8.1.2 Desparafinización del tejido montado sobre laminillas.	40
5.8.1.3 Técnica Inmunohistoquímica.	40
5.8.1.4 Contraintinción con hematoxilina.	41
5.9 Tinciones histológicas.	42
5.10 Análisis histológico.	42
5.11 Análisis de Inmunohistoquímica.	43
5.12 Microdilución en placa.	43
5.13 Análisis estadístico.	44
<b>6. Resultados</b>	
6.1 Efecto del fenofibrato <i>in vitro</i> sobre la viabilidad de <i>N. brasiliensis</i> .	45
6.2 Evaluación clínica.	46
6.2.1 Evaluación clínica del efecto del fenofibrato durante el establecimiento del actinomicetoma.	46
6.2.2 Evaluación del efecto del fenofibrato sobre el actinomicetoma establecido.	53
6.3 Evaluación de la angiogénesis.	58
6.3.1 Evaluación de la angiogénesis bajo el tratamiento con fenofibrato durante el establecimiento del actinomicetoma.	58
6.3.2 Evaluación de la angiogénesis bajo el tratamiento con fenofibrato sobre el actinomicetoma establecido.	63
<b>7. Discusión</b>	67
<b>8. Conclusiones</b>	74
<b>9. Referencias</b>	75
<b>Anexos</b>	
Anexo I- Preparación de reactivos.	81
<b>Resumen autobiográfico</b>	83



## Lista de figuras

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Sitio de lesión, desarrollo del micetoma.	1
2	Distribución geográfica del actinomicetoma en la República Mexicana.	4
3	Evolución clínica del actinomicetoma, según el tamaño de la lesión.	5
4	Tinción tricrómica de Masson del tejido de micetoma.	9
5	Etapas del proceso de angiogénesis.	13
6	Familia de proteínas VEGF y VEGFR.	15
7	Gen de VEGF-A.	16
8	Angiogénesis patológica.	18
9	Composición de la pared de vasos sanguíneos.	20
10	Participación de eNOS en la angiogénesis.	25
11	Estructura del fenofibrato.	29
12	Estrategia experimental.	35
13	Lesiones características del actinomicetoma experimental por <i>N. brasiliensis</i> .	46
14	Lesiones del actinomicetoma experimental durante el establecimiento de la enfermedad.	47
15	Efecto del fenofibrato y la aminoguanidina durante el establecimiento del actinomicetoma experimental.	48
16	Formación de microabscesos en el actinomicetoma experimental.	50
17	Cambios vasculares, tisulares y óseos en el actinomicetoma experimental.	51
18	Modificación de las lesiones durante el establecimiento del actinomicetoma experimental de ratones tratados con fenofibrato y aminoguanidina.	52
19	Desarrollo de la angiogénesis en el actinomicetoma experimental.	52
20	Número de vasos sanguíneos en el actinomicetoma experimental establecido en ratones tratados con fenofibrato y aminoguanidina.	53
21	Lesiones del actinomicetoma experimental establecido.	54
22	Efecto del fenofibrato y la aminoguanidina en el actinomicetoma experimental establecido.	55

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>23</b>	Modificación de las lesiones en el actinomicetoma experimental establecido de ratones tratados con fenofibrato y aminoguanidina.	<b>57</b>
<b>24</b>	Número de vasos sanguíneos en el actinomicetoma experimental establecido en ratones tratados con fenofibrato y aminoguanidina.	<b>57</b>
<b>25</b>	Inmunoreactividad de VEGF en tejido infectado durante el establecimiento del actinomicetoma.	<b>59</b>
<b>26</b>	Inmunoreactividad de eNOS en tejido infectado durante el establecimiento del actinomicetoma.	<b>59</b>
<b>27</b>	Expresión de VEGF en tejido de actinomicetoma.	<b>60</b>
<b>28</b>	Expresión de VEGF en tejido de actinomicetoma durante el establecimiento de la enfermedad.	<b>60</b>
<b>29</b>	Expresión de eNOS en tejido de actinomicetoma.	<b>61</b>
<b>30</b>	Expresión de eNOS en tejido de actinomicetoma durante el establecimiento de la enfermedad.	<b>61</b>
<b>31</b>	Inmunoreactividad de LYVE-1 en tejido infectado durante el establecimiento del actinomicetoma.	<b>62</b>
<b>32</b>	Expresión de LYVE-1 en tejido de actinomicetoma.	<b>62</b>
<b>33</b>	Inmunoreactividad de VEGF en tejido con actinomicetoma establecido.	<b>64</b>
<b>34</b>	Expresión de VEGF en tejido con actinomicetoma establecido.	<b>64</b>
<b>35</b>	Inmunoreactividad de eNOS en tejido con actinomicetoma establecido.	<b>65</b>
<b>36</b>	Expresión de eNOS en tejido con actinomicetoma establecido.	<b>65</b>
<b>37</b>	Inmunoreactividad de LYVE-1 en tejido con actinomicetoma establecido.	<b>66</b>

## Lista de Tablas

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Filogenia de <i>N. brasiliensis</i> .	<b>6</b>
<b>2</b>	Utilización de fuentes de carbono por <i>N. brasiliensis</i> .	<b>7</b>
<b>3</b>	Perfil enzimático de <i>N. brasiliensis</i> .	<b>7</b>
<b>4</b>	Criterios para la evaluación clínica del actinomicetoma por <i>N. brasiliensis</i> .	<b>8</b>
<b>5</b>	Factores que estimulan el proceso de angiogénesis.	<b>11</b>
<b>6</b>	Factores que inhiben el proceso angiogénico.	<b>12</b>
<b>7</b>	Solubilidad del fenofibrato.	<b>29</b>
<b>8</b>	Condiciones de trabajo para los anticuerpos empleados.	<b>41</b>
<b>9</b>	Evaluación del desarrollo de las lesiones durante el establecimiento del actinomicetoma experimental.	<b>47</b>
<b>10</b>	Porcentaje de ratones en relación al grado de la lesión durante el establecimiento del actinomicetoma bajo tratamiento con fenofibrato o aminoguanidina.	<b>49</b>
<b>11</b>	Evaluación del desarrollo de las lesiones en ratones con actinomicetoma experimental establecido.	<b>54</b>
<b>12</b>	Porcentaje de ratones en relación al grado de la lesión en el actinomicetoma establecido bajo tratamiento con fenofibrato o aminoguanidina.	<b>56</b>

## Abreviaturas

<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>CMC</b>	Carboximetilcelulosa
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>cm<sup>3</sup></b>	Centímetros cúbicos
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentración plasmática requerida de un agonista para obtener el 50% de un máximo efecto <i>in vivo</i> .
<b><i>et al.</i></b>	Y colaboradores; otros autores
<b>fig.</b>	Figura
<b>g</b>	Gramos
<b>h</b>	Hora(s)
<b>KDa</b>	KiloDaltones
<b>kg</b>	Kilogramos
<b>M</b>	Concentración molar
<b>min</b>	Minutos
<b>mg</b>	Miligramos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mmHg</b>	Milímetros de mercurio
<b>µg</b>	Microgramos
<b>µl</b>	Microlitros
<b>µM</b>	Concentración micromolar
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias

## Resumen

**Q. F. B. Flora Eduarda Cruz López**

**Fecha de graduación: Julio, 2015**

**Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina**

**Título:** "El papel de la angiogénesis en la patogenia del actinomicetoma por *N. brasiliensis*."

**Número de páginas:** 82

Candidato al Grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunología Médica.

**Área de estudio:** Inmunología Médica.

**Objetivo:** Investigar el papel de la angiogénesis durante el desarrollo del actinomicetoma y sobre el actinomicetoma establecido en un modelo experimental.

**Material y métodos:** se determinó si el fenofibrato inhibe el crecimiento de la bacteria mediante la técnica de microdilución en placa. Se administró una suspensión de fenofibrato vía orogástrica cada 24 h durante el establecimiento del actinomicetoma y sobre el actinomicetoma establecido en ratones BALB/c infectados con la cepa *N. brasiliensis* HUJEG-1 (ATCC 700358). El tratamiento en ambos casos tuvo una duración de 45 días, tiempo en el que se evaluaron las diferencias en inflamación y la evolución clínica de las lesiones, empleando un vernier y la ecuación elipsoidea. También se realizó el análisis histológico en el sitio de la infección mediante tinciones con hematoxilina y eosina. El proceso de angiogénesis fue evaluado a diferentes tiempos en la administración del tratamiento mediante inmunohistoquímica, buscando como marcadores de vasos sanguíneos las moléculas VEGF, eNOS, y LYVE-1, este último como un marcador indirecto del proceso angiogénico.

**Resultados:** se comprobó que el fenofibrato no inhibe el crecimiento de la bacteria a la concentración correspondiente a  $EC_{50}$  en ratones. Las lesiones características de la enfermedad se desarrollaron en un menor número de ratones que recibieron el tratamiento de fenofibrato, durante el establecimiento del actinomicetoma y sobre el actinomicetoma establecido. Además, se observó una disminución en las medidas de inflamación y en la aparición de lesiones histológicas, así como una disminución en el número de vasos sanguíneos en los sitios de la infección.

**Conclusiones:** La angiogénesis contribuye a la patogenia del actinomicetoma por *N. brasiliensis*; la disminución de la formación de vasos sanguíneos por el tratamiento con fenofibrato limita el grado de la lesión.

Firma del asesor

---

Dr. C. Mario César Salinas Carmona

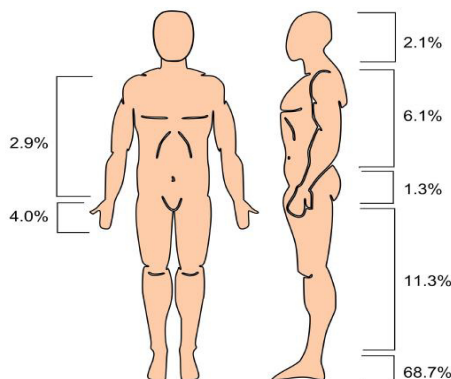
# Capítulo I

## Introducción

### 1.1 Mictoma.

El mictoma es una infección inflamatoria crónica subcutánea, caracterizada por el desarrollo de abscesos con tractos fistulosos por los cuales drenan secreciones sanguíneo-purulentas con presencia de gránulos consistentes en colonias del agente causal, restos celulares y células polimorfonucleares (1-5).

La infección es adquirida por inoculación traumática en la piel con material contaminado y se extiende lentamente hacia áreas adyacentes de la lesión, involucrando piel y estructuras profundas, provocando además deformidades y pérdida de la función. Generalmente afecta extremidades inferiores, siendo el pie el sitio más comúnmente afectado (Fig. 1). La lesión tiende a ser localizada, indolora y sin manifestaciones sistémicas, a menos que se vean involucradas otras regiones, como tórax, cuello, cabeza y columna vertebral, presentándose entonces síntomas respiratorios y neurológicos (1, 6-9).



**Fig. 1.** Sitio de lesión, desarrollo del mictoma (López Martínez, 2013).

El micetoma puede ser causado por hongos o por bacterias, siendo entonces clasificado como eumicetoma o actinomicetoma, respectivamente (1, 4, 6). Afecta con mayor frecuencia a hombres en un rango de 30 a 40 años de edad. Se han propuesto tres aspectos necesarios para que esta infección se establezca: la cantidad del inóculo, el estado del sistema inmune del hospedero, y la adaptación hormonal. La ocupación del paciente también influye en la presentación de la enfermedad, pues es común en personas que trabajan en condiciones rudimentarias sin prendas de protección o zapatos, en el campo o al aire libre (10).

## **1.2 Agentes causales de micetoma.**

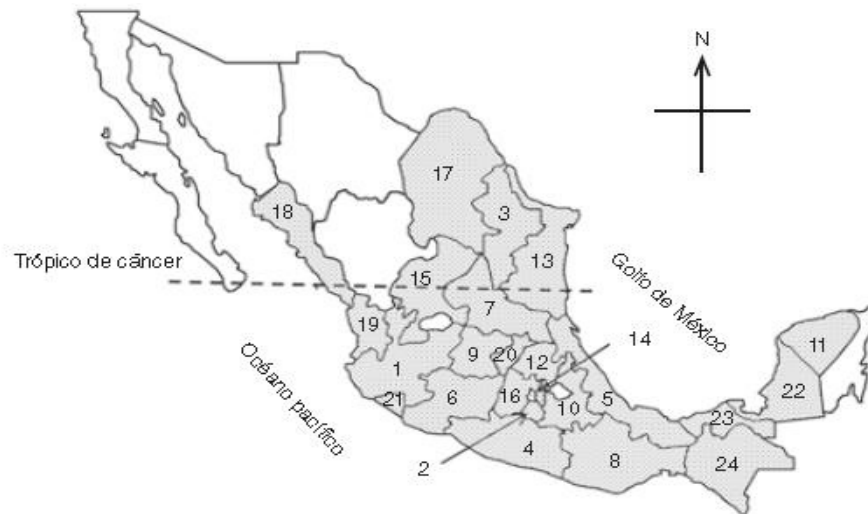
Las bacterias (actinomicetos) más comunes como agentes causales de actinomicetomas son *Actinomadura madurae*, *Streptomyces somaliensis*, *Actinomadura pelletrieri*, *Nocardia brasiliensis*, y *Nocardia asteroides*. *Madurella mycetomatis* es considerado el hongo (eumiceto) más común en ocasionar eumicetomas. Otros como *Scedosporium boydii*, *Falciformispora senegalensis* y *Trematosphaeria grisea* son ocasionalmente aislados en los casos de eumicetoma (7).

### 1.3 Distribución geográfica.

El micetoma representa una enfermedad clásica, considerada como descuidada. Es endémica de regiones tropicales y subtropicales, afecta principalmente poblaciones con niveles socioeconómicos bajos y regiones rurales de África, América Latina y Asia, en latitudes definidas como el cinturón del micetoma. Dicha región se encuentra localizada alrededor del trópico de Cáncer, entre las latitudes 15° Sur y 30° Norte, comprendiendo los países con las tasas más altas de infección. Entre los países incluidos en esta región se encuentran Sudán, Somalia, Senegal, India, Yemen, México y Venezuela (7, 11-15).

Los datos reportados por Bonifaz *et al.* en el 2014 revelan que en México el 92% de los casos de micetoma son clasificados como actinomicetoma, dentro de los cuales el 76% son debido a *N. brasiliensis*, siendo el principal agente causal de actinomicetomas en este país (10). En el 2013, López – Martínez *et al.* encontraron una amplia distribución geográfica del actinomicetoma, reportando casos en 24 de los 31 estados de la República Mexicana. Los estados con mayor incidencia son Jalisco, Morelos, Nuevo León y Veracruz (Fig. 2) (9).





Estado	Casos	Estado	Casos	Estado	Casos	Estado	Casos	Estado	Casos
(1) Jalisco	676	(6) Michoacán	243	(11) Yucatán	94	(16) Edo. de México	44	(21) Colima	13
(2) Morelos	429	(7) San Luis Potosí	229	(12) Hidalgo	67	(17) Coahuila	36	(22) Campeche	9
(3) Nuevo León	347	(8) Oaxaca	172	(13) Tamaulipas	66	(18) Sinaloa	34	(23) Tabasco	6
(4) Guerrero	302	(9) Guanajuato	163	(14) Distrito Federal	49	(19) Nayarit	24	(24) Chiapas	3
(5) Veracruz	264	(10) Puebla	138	(15) Zacatecas	49	(20) Querétaro	14	Sin reportar	462

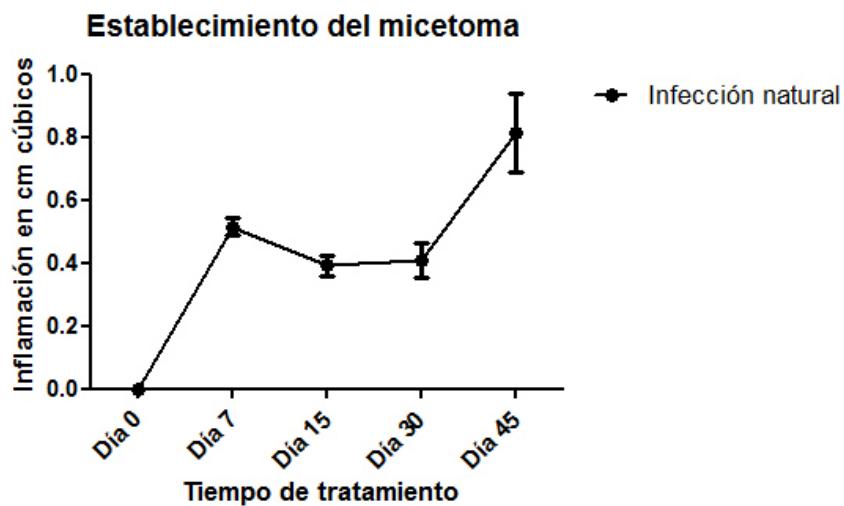
**Figura 2.** Distribución geográfica del actinomictoma en la República Mexicana (López-Martínez *et al.*, 2013).

#### 1.4 *Nocardia brasiliensis*.

*N. brasiliensis* es una bacteria intracelular, filamentosa, Gram-positiva, aerobia, parcialmente ácido-alcohol resistente, saprófita de suelos, no móvil. La bacteria es capaz de inducir un ambiente de inmunosupresión favoreciendo su crecimiento, mientras que el tamaño de las lesiones cambia conforme avanza el desarrollo del actinomictoma (2-4, 16-21).

El estudio del actinomictoma por este agente causal anteriormente se ha establecido en distintos modelos animales. Tras diferentes intentos por diversos

investigadores para encontrar el modelo óptimo que les permitiera estudiar el curso de la infección, en 1999 Salinas-Carmona *et al.* desarrollaron un modelo de actinomicetoma por *N. brasiliensis* en ratones BALB/c infectados en el cojinete plantar. En el modelo experimental, se produce inflamación en los primeros días de la infección y disminuye entre los días 7 y 15. La inflamación aumenta notablemente al día 30, considerando a la infección como establecida. El tamaño de la lesión sigue incrementando conforme pasa el tiempo (Fig. 3). Los ratones BALB/c inoculados con este patógeno reproducen la enfermedad que se desarrolla en humanos. La respuesta humoral de los ratones infectados es semejante a la que se desencadena en humanos, con presencia de anticuerpos dirigidos contra *N. brasiliensis* (16, 22, 23).



**Fig. 3.** Evolución clínica del actinomicetoma, según el tamaño de la lesión. Cada punto representa el promedio de las medidas por día de evaluación  $\pm$  SEM.

### 1.5 Taxonomía e identificación de *N. brasiliensis*.

*N. brasiliensis* es caracterizada por un alto contenido de nucleótidos G y C (60 - 70%), y ácidos grasos con tres dobles enlaces y una mayor proporción de cadenas insaturadas, con una longitud de 46 a 60 carbonos en su pared celular (nocardomicolatos). La filogenia de esta bacteria se muestra en la tabla 1 (24).

**Tabla 1.** Filogenia de *N. brasiliensis*.

Dominio	Eubacteria
Reino	Bacterias
Filo	Bacterias
Clase	Actinobacteriae
Subclase	Actinobacteridae
Orden	Actinomycetales
Suborden	Corinebacterineae
Familia	Nocardiaceae
Género	<i>Nocardia</i>
Especie	<i>brasiliensis</i>

Entre las pruebas para la identificación de actinomicetos se encuentran el examen directo de granos a partir de una biopsia o muestra de tejido infectado, a los que se les añade NaOH o KOH al 10%, para observar presencia de hifas o clavos, pigmento, septación de filamentos, y presencia o ausencia de cuerpos esporulados. Estas preparaciones pueden ser teñidas con Gram o Kinyoun. El cultivo de los granos se realiza en caldos BHI, Saboraud, o caldo peptona extracto de levadura, y en Patata-Dextrosa Agar. Los cultivos son incubados a 37°C y 25°C. Las colonias en agar nutritivo son de color anaranjado, granulares, acumuladas con hifa aérea escasa y blanca.

Al microscopio se observan filamentos ramificados, presentando fragmentación que empieza desde el centro de la colonia, produciendo células bacilares y cocoides irregulares. El sistema bioquímico para la identificación de *N. brasiliensis* consiste en la utilización de carbono como fuente de energía y la presencia o ausencia de ciertas enzimas (Tablas 2 y 3) (25).

**Tabla 2.** Utilización de fuentes de carbono de *N. brasiliensis*.

Glu	Ara	Suc	Xyl	Ino	Man	Fru	Rha	Raf	Cel
+	-	-	-	+	-	+	-	-	-

Glu: glucosa, Ara: arabinosa, Suc: sacarosa, Xyl: xilosa, Ino: inositol, Man: manosa, Fru: fructosa, Rha: ramnosa, Raf: rafinosa, Cel: celobiosa.

**Tabla 3.** Perfil enzimático de *N. brasiliensis*.

Ge	Cit	Ure	Arg	Onp	Trp	Lys	Odc	Vp	Ind	H <sub>2</sub> S
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Ge: gentobiosa, Cit: citratos, Ure: urea, Arg: arginina, Onp: orto-nitro-fenil-D-galactopiranósido, Trp: triptófano, Lys: lisina, Odc: ornitina, VP: Vogues-Proskauer, Ind: indol, H<sub>2</sub>S: ácido sulfhídrico.

### 1.6 Histopatología del actinomicetoma.

Histológicamente, las lesiones en humanos revelan la presencia de reacciones inflamatorias granulomatosas con abscesos que contienen gránulos del organismo infeccioso. Los gránulos consisten en masas de filamentos embebidos en cemento

intracelular. En ocasiones estos gránulos se encuentran rodeados por estructuras en forma de mazo (4).

Los criterios para la clasificación del actinomicetoma según su evolución fueron descritos por Salinas-Carmona *et al.* en 1999, tomando en cuenta el tamaño y la aparición de las lesiones en su modelo experimental murino (22). Dichos criterios se mencionan en la tabla 4.

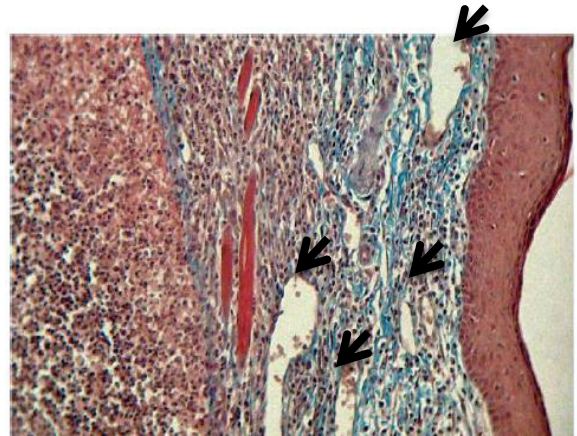
**Tabla 4.** Criterios para la evaluación clínica del actinomicetoma por *N. brasiliensis* (Salinas Carmona *et al.* 1999).

Tipo I (+)	Edema ligero.
Tipo II (++)	Edema de 7 mm, abscesos y úlceras.
Tipo III (+++)	Edema, abscesos, descarga de gránulos.
Tipo IV (++++)	Micetoma completo, con edema, abscesos, úlceras, descarga de gránulos, fibrosis. Forma elipsoide.

Estudios histológicos del sitio de infección en el modelo experimental de actinomicetoma por *N. brasiliensis* demuestran gran infiltrado celular e inflamación, la formación de microabscesos bien definidos alrededor de gránulos de la bacteria, además de destrucción tisular (3). A medida que la infección tiende a la cronicidad, el infiltrado inflamatorio agudo es reemplazado por la aparición de granulomas fibrosos, constituidos por macrófagos, células gigantes multinucleadas, células espumosas, células plasmáticas y linfocitos, todos ellos rodeados por una cápsula de tejido fibroso con colágena (26). Se

ha observado el desarrollo de vasculitis (27) y se puede apreciar la aparición de nuevos vasos sanguíneos, aunque este último aspecto no se ha descrito ni ha sido estudiado (Fig. 4).

**Fig. 4.** Tinción tricrómica de Masson del tejido de actinomicetoma. Vasos sanguíneos indicados por flechas. Soto-Solís *et al.*, 2008.



### **1.7 Tratamientos para pacientes con actinomicetoma.**

El tratamiento actual para el actinomicetoma se basa en antibióticos. Los primeros agentes antimicrobianos utilizados con buenos resultados de estas infecciones en 1941 fueron sulfanilamida y sulfadiazina. Posteriormente, isoniazida, estreptomina, rifampicina y minociclina fueron utilizados con una tasa de remisión variable. A finales de 1960 fue utilizado trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), el cual se ha convertido en el estándar de oro para el tratamiento de esta enfermedad; sin embargo, su uso da lugar a reacciones adversas, tales como malestares intestinales, rash, y efectos hematológicos, entre ellos anemia y leucopenia. Los mejores resultados se han observado al combinar el tratamiento de SXT con estreptomina. En pacientes que no responden al tratamiento de

manera adecuada al SXT, es requerida la administración de amoxicilina-ácido clavulánico (4).

Welsh *et al.* en 1987 reportaron la remisión de pacientes infectados con *N. brasiliensis* al ser tratados con amikacina, en monoterapia o en combinación con SXT. A pesar de los efectos tóxicos conocidos del uso de amikacina, los pacientes no mostraron efectos colaterales (28).

Gómez – Flores *et al.* han demostrado la susceptibilidad *in vitro* de la cepa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 ante amikacina, amoxicilina-ácido clavulánico, ceftriaxona, gentamicina, isepamicina, minociclina, netilmicina, nitroxolina, espiramicina y SXT (29). Cuando se presenta resistencia a amikacina, el tratamiento puede ser sustituido por netilmicina. Otros agentes antimicrobianos han mostrado actividad *in vitro* contra *N. brasiliensis*, como el moxifloxacino, gatifloxacino y garenoxacino (4).

## **1.8 Angiogénesis.**

La angiogénesis es un proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente, e implica la migración y proliferación de células endoteliales con la consecuente formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares que darán lugar a vasos sanguíneos estables. Este proceso es altamente ordenado y finamente regulado por un conjunto de factores que actúan como

activadores e inhibidores, y por factores de diferenciación, de supervivencia y la expresión de receptores específicos, además de moléculas de adhesión célula-célula y célula-matriz (Tabla 5 y 6). Ocurre con mayor frecuencia durante la embriogénesis y es regulado negativamente en la etapa adulta, durante la cual se desarrolla en eventos ligados a la fisiología, como el ciclo menstrual, el ciclo de crecimiento del cabello, y la reparación de heridas (30-32).

**Tabla 5.** Factores que estimulan el proceso de angiogénesis (Carmeliet y Jain, 2003) (33).

<b>Factores pro-angiogénicos</b>	<b>Función</b>
VEGF (familia)	Angio/vasculogénesis, permeabilidad, adhesión leucocitaria.
VEGFR (familia), NRP-1	Señales de supervivencia, señalización angiogénica.
Ang1 y Tie2	Estabilización de vasos, inhibe la permeabilidad.
PDGF-BB y receptores	Reclutamiento de células de músculo liso.
TGF- $\beta$ 1, endogilina, receptores de TGF- $\beta$	Estimula la producción de matriz extracelular.
FGF, HGF, MCP-1	Estimula angio/arteriogénesis.
Integrinas $\alpha_v\beta_3$ , $\alpha_v\beta_5$ , $\alpha_5\beta_1$	Receptores para macromoléculas de matriz y proteinasas.
VE-cadherina; PECAM (CD31)	Moléculas de unión endotelial.
Efrinas	Regula la especificación arterial/venosa.
Activadores del plasminógeno, MMPs	Remodelación de matriz; libera y activa factores de crecimiento.
PAI-1	Estabiliza vasos nascentes.
NOS; COX-2	Estimula la angiogénesis y vasodilatación.
AC133	Regula la diferenciación angioblástica.
Quimiocinas	Actividades pleiotrópicas.
Id1/Id3	Determina la plasticidad endotelial.

VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular, VEGFR: receptor de VEGF, NRP-1: neuropilina-1, Ang1: angiopoyetina-1, Tie2: receptor 2 de angiopoyetina, PDGF-BB: factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB, TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante- $\beta$ , FGF: factor de crecimiento de fibroblastos, HGF: factor de crecimiento



de hepatocitos, MCP-1: proteína quimioattractante de monocitos-1, VE-cadherina: cadherina de endotelio vascular, PECAM: molécula de adhesión a células endoteliales-plaquetas, MMPs: metaloproteinasas de la matriz extracelular, PAI-1: inhibidor activador de plasminógeno-1, NOS: sisntasas de óxido nítrico, COX-2: ciclooxigenasa-2, Id1/Id3: el inhibidor de la unión al ADN.

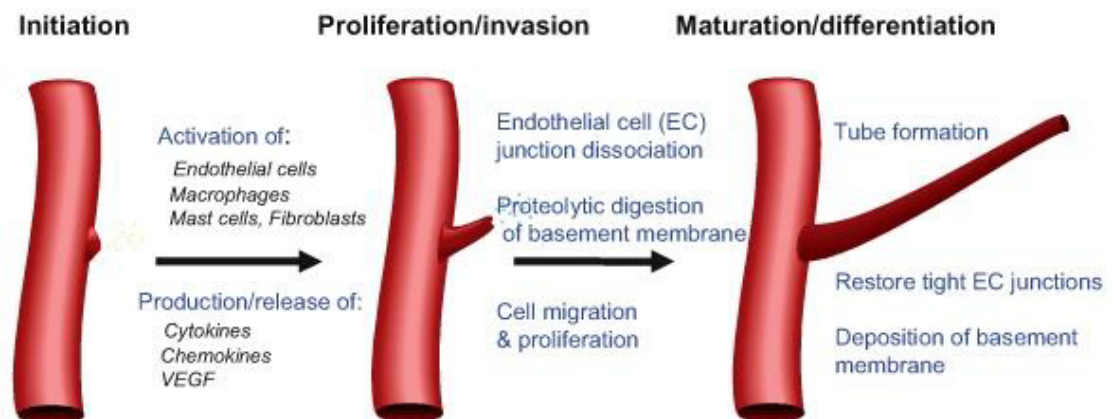
**Tabla 6.** Factores inhibidores del proceso angiogénico (Carmeliet y Jain, 2003) (33).

<b>Factores anti-angiogénicos</b>	<b>Función</b>
VEGFR-1, sVEGFR-1, sNRP-1.	Inhibe VEGF-A, VEGF-B, PIGF.
Ang2	Agonista de Ang1.
TSP-1, -2	Inhibe la migración endotelial, crecimiento, adhesión y supervivencia.
Angiostatina	Suprime angiogénesis en tumores.
Endostatina	Inhibe supervivencia y migración endotelial.
Vasostatina, calreticulina	Inhibe crecimiento endotelial.
Factor plaquetario-4	Inhibe la unión de bFGF y VEGF.
TIMPs, inhibidores de MMP, PEX	Suprime la angiogénesis patológica.
IFN- $\alpha$ , - $\beta$ ; IP-10, IL-4, -12, 18	Inhibidores de la migración endotelial, regulación negativa de bFGF.
Protrombina-2, fragmento III antitrombina	Suprime el crecimiento endotelial.
Prolactina	Inhibe bFGF/VEGF.
VEGI	Modula el crecimiento celular.
Fragmento de SPARC	Inhibe la actividad y la unión a endotelio de VEGF.
Fragmento osteopontina	Interfiere la señalización de integrinas.
Maspina	Inhibidor de proteasas.

VEGFR-1: receptor de factor de crecimiento de endotelio vascular-1, sVEGFR-1: receptor soluble de factor de crecimiento de endotelio vascular-1, sNRP-1: neuropilina soluble-1, TSP-1, -2: trombospondina-1 y -2, TIMPs: inhibidor tisular de metaloproteinasas, IFN: interferón, IP-10: CXC-10, IL: interleucina, VEGI: inhibidor de crecimiento de endotelio vascular.

El proceso es crucial en procesos patológicos, donde se requiere de un suministro de oxígeno y nutrientes para las células y tejidos en crecimiento (34, 35), tal como se observa en el desarrollo de tumores y metástasis, enfermedades cardiovasculares e inflamatorias (36). Puede ser desencadenado por diferentes estímulos, entre ellos cambios en la presión arterial, hipoxia, y daño tisular que acompaña a la inflamación, comenzando con la desestabilización de vasos sanguíneos maduros y estables ante la presencia de factores anti-angiogénicos. Las células que conforman los vasos sanguíneos son activadas y liberan citocinas, quimiocinas y factores pro-angiogénicos; las uniones entre células endoteliales se disocian, se digiere proteolíticamente la membrana basal, aumenta la permeabilidad y las células endoteliales migran para formar estructuras parecidas a tubos. Las células que no migran y se mantienen en el vaso preexistente proliferan y sustituyen a las células que migraron. Las uniones entre las células endoteliales se restauran, se deposita una nueva membrana basal, y la estructura formada es rodeada por pericitos para establecer vasos maduros (Fig. 5) (33, 35, 37).

**Fig. 5.** Etapas del proceso de angiogénesis (Granger y Senchenkova, 2010).



La angiogénesis y la inflamación han sido procesos relacionados entre sí, debido a la formación de nuevos vasos sanguíneos en los granulomas y la dualidad de los factores angiogénicos, los cuales también poseen efectos pro-inflamatorios. La angiogénesis que acompaña a la inflamación crónica tiende a prolongar e intensificar la respuesta inflamatoria (37).

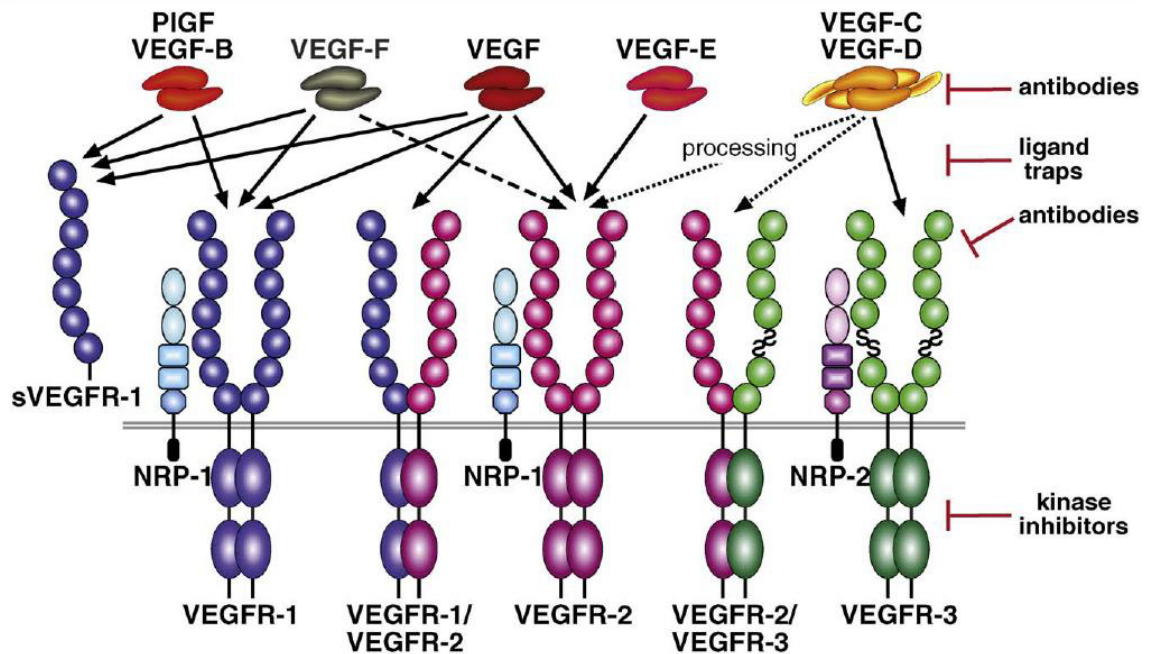
La inflamación aguda induce cambios en la vasculatura contribuyendo a la dilatación, al incremento en el flujo sanguíneo y al incremento en la permeabilidad vascular, lo que conlleva al desarrollo de tumefacciones y edema, y a un incremento en las interacciones entre células endoteliales y leucocitos en la sangre. Durante la inflamación, las células endoteliales permanecen en estado activo, expresando altos niveles de moléculas de adhesión y quimiocinas, facilitando así el reclutamiento continuo de leucocitos a los sitios de daño (32). Las células reclutadas son capaces de producir factores pro-angiogénicos promoviendo la atracción y proliferación de células endoteliales (38, 39).

### **1.9 Factor de crecimiento de endotelio vascular.**

Uno de los factores pro-angiogénicos más importantes es el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), una familia de moléculas conformada por siete glicoproteínas que participan en mayor o menor grado durante el proceso de

angiogénesis. Cada uno de los factores se une con diferentes especificidades a los receptores VEGFR.

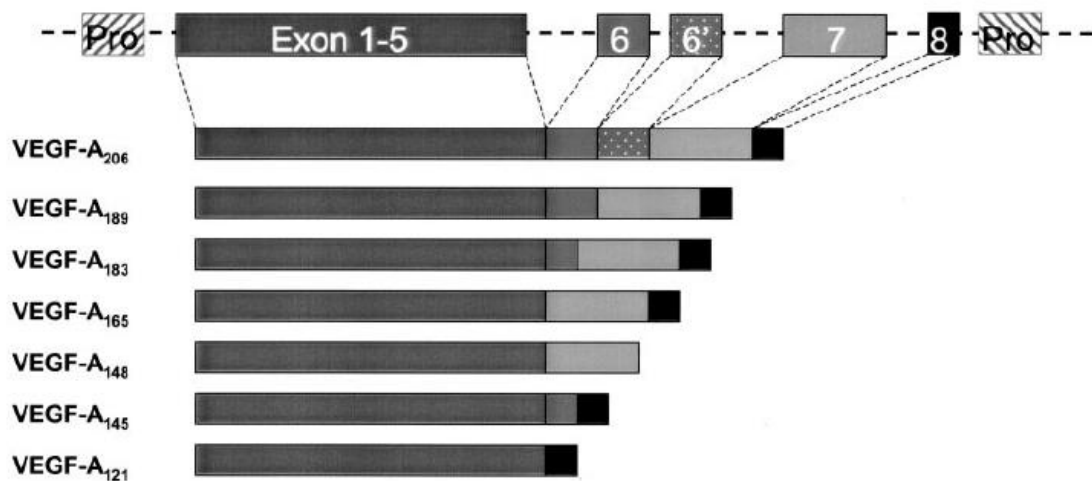
Otros receptores, las neuropilinas, funcionan como correceptores de moléculas específicas de VEGF (Fig. 6). La proteína VEGF-A (o comúnmente denominada solo como VEGF) es el regulador principal del crecimiento de células de vasos sanguíneos derivadas del endotelio. Esta proteína incrementa la permeabilidad vascular y previene la apoptosis inducida por la privación de suero, protegiendo a las células del estrés provocado por hipoxia. La señalización a través del receptor VEGFR-2, tras la unión de VEGF, es la vía con mayor actividad pro-angiogénica (34, 35, 40-44).



**Fig. 6.** Familia de proteínas VEGF y VEGFR (Lohela *et al.*, 2009).

VEGF es un factor crítico en las etapas iniciales en el proceso de la formación de vasos sanguíneos, es un potente inductor de la neovascularización y la angiogénesis, y es también necesario para el mantenimiento de los vasos sanguíneos diferenciados (45). Es producido por células mesenquimales y de estroma, queratinocitos, células T activadas, células dendríticas, neutrófilos y macrófagos (34, 46).

VEGF se expresa en distintas isoformas (Fig. 7). Es una glicoproteína de 34 -42 kDa, dimérica, con presencia de puentes disulfuro en su estructura. Existen al menos seis isoformas, de 121, 145, 148, 165, 189 y 206 aminoácidos. La isoforma comúnmente expresada es VEGF<sub>165</sub>, y es la más potente en términos de angiogénesis. VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>165</sub> son secretados al ambiente extracelular, mientras que VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub> permanecen asociados a células o a la matriz (34, 41, 43).



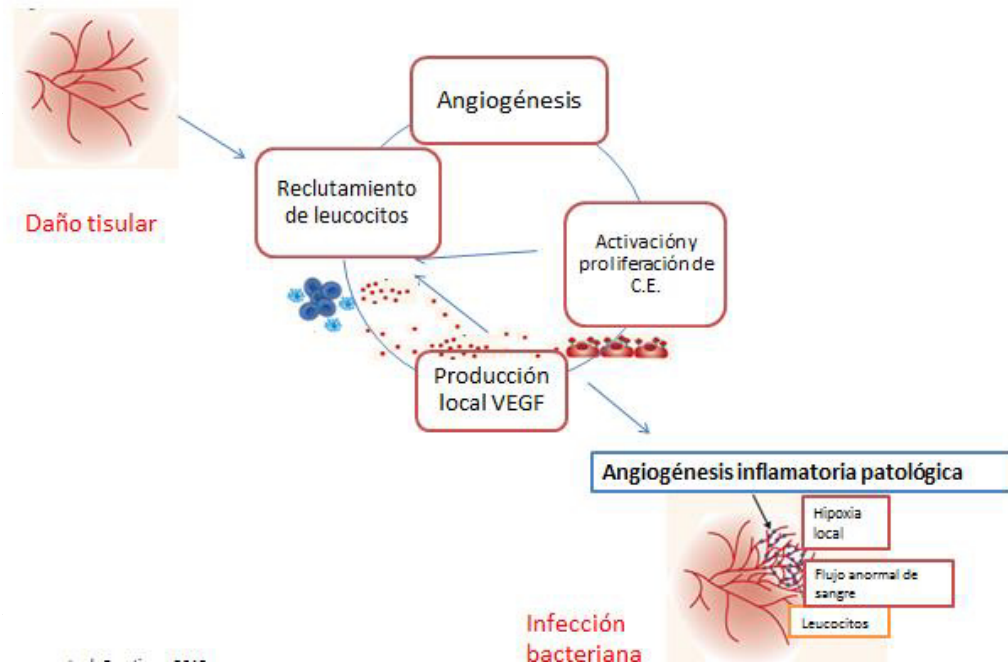
**Fig. 7.** Gen de VEGF-A (Hoeben *et al.*, 2004).

Un ambiente proinflamatorio puede promover la actividad de VEGF (47), y un ambiente de hipoxia puede incrementar su expresión (36). Los bajos niveles de oxígeno incrementan la concentración intracelular del factor inducible de hipoxia-1 (HIF-1), lo cual estimula la transcripción del gen que codifica VEGF (48). La expresión de VEGF es también inducida, en forma independiente de HIF-1, en respuesta a la falta de nutrientes a través de la inducción del receptor co-activador de la proliferación de peroxisomas  $\gamma$ -1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ). Otros factores de crecimiento, citocinas inflamatorias, oncogenes y hormonas han sido reportados como inductores de VEGF (44).

Las células dañadas y los leucocitos reclutados producen y liberan VEGF; la producción local induce a su vez al reclutamiento de más células y a la activación de células endoteliales para su proliferación, migración y producción de este factor pro-angiogénico, atrayendo a más leucocitos al sitio de daño. Todo lo anterior estimula el inicio de la angiogénesis, tomando en cuenta la presencia de otros factores pro y anti-angiogénicos.

Bajo el contexto de una infección bacteriana, el incremento en el consumo de oxígeno por las bacterias en crecimiento, la acumulación de fagocitos en el sitio de infección y la vasoconstricción local impiden la llegada de oxígeno al sitio de inflamación ocasionando un estado de hipoxia, incrementando así el estímulo de angiogénesis patológica (Fig. 8) (49).

**Fig. 8.** Angiogénesis patológica.



La administración de VEGF puede iniciar la formación de vasos sanguíneos en modelos animales (50). El uso de bevacizumab, un anticuerpo anti-VEGF recombinante, ha demostrado inhibir la angiogénesis, el crecimiento de tumores y metástasis en diferentes modelos de estudio (51).

En determinadas enfermedades infecciosas se ha descrito a la angiogénesis como un proceso importante para el establecimiento de enfermedades vasculoproliferativas. Tal es el caso de infecciones ocasionadas por *Chlamydia pneumoniae*, *Treponema pallidum*, *Helicobacter pylori*, y especies del género *Bartonella* (36, 47, 52-56). Resultados no publicados en nuestro laboratorio sugieren que dicho proceso pudiera

tener un papel importante en el desarrollo del actinomicetoma. Otros autores han sugerido que la expresión de VEGF y la angiogénesis están involucrados en el desarrollo de eumicetomas ocasionados por *M. mycetomatis*. (57, 58).

### **1.10 Estructura de los vasos sanguíneos.**

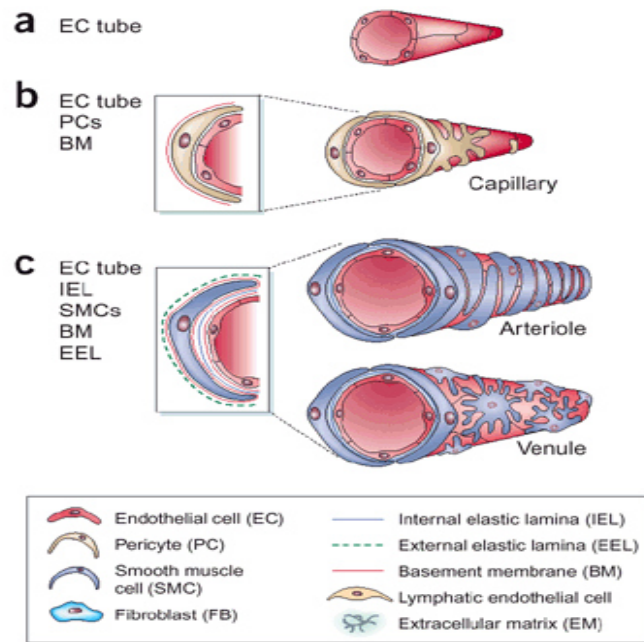
Los vasos sanguíneos son estructuras tubulares conformadas por células endoteliales. La capacidad de estas células para migrar hacia otras regiones permite a los tejidos recibir un suplemento de sangre con nutrientes y oxígeno adecuados para su correcto funcionamiento. Las venas y las arterias son los vasos sanguíneos más grandes, poseen una pared gruesa y resistente de tejido conectivo y muchas capas de células de músculo liso. Esta pared está forrada de una capa única extremadamente delgada de células endoteliales, separada de la capa exterior que rodea por una lámina basal. En ramas más delgadas de la vasculatura, como los capilares y los sinusoides, la pared consiste en células endoteliales, lámina basal, y pericitos dispersos, los cuales se envuelven a sí mismos alrededor de la estructura (Fig. 9) (48).

Las células endoteliales cubren por completo el sistema vascular, controlan el paso de materiales y el tránsito de leucocitos, dentro y fuera de la sangre. Las células endoteliales influyen en la maduración de los vasos sanguíneos a través de la transmisión de señales y secreción de proteínas, las cuales permiten el reclutamiento de los componentes anteriormente mencionados. Una vez que estas estructuras han



madurado, las señales que envían las células endoteliales hacia las demás capas son importantes en la regulación de la función y la estructura vascular (48).

**Fig. 9.** Composición de la pared de vasos sanguíneos.



### 1.11 Linfangiogenesis.

La linfangiogenesis consiste en la formación de nuevos vasos linfáticos, los cuales contribuyen a la homeostasis del fluido en los tejidos y a la inmunidad, al facilitar el movimiento de células del sistema inmune por todo el organismo. Se ha asumido que

la angiogénesis vascular es uno de los requisitos para que se lleve a cabo la linfangiogénesis. Además, ambos procesos pueden ocurrir de forma simultánea (59-61).

Los vasos linfáticos también están conformados por células endoteliales. Las proteínas C y D de la familia de VEGF participan en la regulación del desarrollo de vasos linfáticos, uniéndose a receptores VEGFR-3, inicialmente expresados en vasos sanguíneos durante la embriogénesis, y posteriormente restringidos a los vasos linfáticos en la etapa adulta (44, 59, 60, 62).

Se ha encontrado que la proteína A de VEGF es capaz de inducir la proliferación y migración de endotelio linfático (61), debido a que su receptor (VEGFR-2) es expresado tanto en vasos sanguíneos como en vasos linfáticos, pero en concentraciones menores en estas últimas estructuras (32). VEGF actúa como un mediador de la inflamación, al ser quimioattractante para monocitos y macrófagos e inducir la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, permitiendo así el reclutamiento de leucocitos a los sitios de daño (32, 61). Esta isoforma y las citocinas proinflamatorias inducen la expresión de VEGF-C y -D. Estas proteínas son responsables de la proliferación, migración, y supervivencia de las células endoteliales que conforman los vasos linfáticos, a través de su unión con VEGFR-2 y VEGFR-3, y son a su vez quimioattractantes para los macrófagos activados (32). La señalización a través de VEGFR-3 puede potenciar los efectos de VEGFR-2 y mantener activa la estimulación

de angiogénesis. Las propiedades moleculares de VEGF-C y -D son un vínculo entre la angiogénesis y la linfangiogénesis (44, 62).

La linfangiogénesis también está involucrada en condiciones de inflamación. Las infecciones bacterianas de vías respiratorias o la inflamación de la piel inducen a una fuerte respuesta linfangiogénica en el tejido afectado y en ganglios linfáticos (32, 62).

### **1.12 Receptor endotelial de vasos linfáticos (LYVE-1).**

El receptor hialuronano de endotelio vascular linfático 1 (LYVE-1) es un homólogo de CD44 (una glicoproteína involucrada en adhesiones celulares). Fue identificado inicialmente como un marcador específico de la superficie de células endoteliales de tejido linfático y en macrófagos activados (32, 37, 63).

LYVE-1 es un receptor transmembranal del hialuronano, una glicosamina extracelular involucrada en la adhesión celular y en la migración, inflamación y metástasis tumoral. Más del 80% del tejido de hialuronano es degradado en los ganglios linfáticos, y LYVE-1 es probablemente el receptor responsable de transportar el hialuronano a nódulos linfáticos (64, 65).

Debido a su expresión en el endotelio linfático, se utilizan anticuerpos dirigidos contra LYVE-1 para identificar procesos de linfangiogénesis en piel y enfermedades inflamatorias (66). Este receptor, entre otros (como VEGFR-3 y Prox1) es de los marcadores más utilizados para identificar vasos linfáticos y puede también ser

expresado en células de endotelio vascular, por lo que es posible ser utilizado como marcador indirecto del desarrollo de angiogénesis (59).

### **1.13 Óxido nítrico.**

El óxido nítrico es un radical libre de corta duración derivado del aminoácido L-arginina a través de la actividad enzimática de diferentes sintasas, las cuales reciben su nombre dependiendo de su localización. Las isoformas son conocidas como nNOS o NOS1 (neuronal), iNOS o NOS2 (inducible) y eNOS o NOS3 (endotelial). A su vez, las sintasas nNOS y eNOS son clasificadas como constitutivas, dependientes de calcio, productoras de NO en pequeñas cantidades. La sintasa iNOS es inducible (denominada así por ser inducida a través de citocinas inflamatorias y endotoxinas de bacterias Gram negativas) y produce altas concentraciones de NO y es calcio independiente (67-69).

El NO es versátil en el sistema inmune, está involucrado en la patogénesis y el control de enfermedades infecciosas, tumores, procesos autoinmunes y enfermedades degenerativas crónicas. En condiciones normales, el NO regula la neurotransmisión, el tono de vasos sanguíneos, la agregación plaquetaria, la permeabilidad vascular, la eliminación de radicales libres, y la interacción entre leucocitos y células endoteliales (68, 69).

### **1.13.1 Sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS).**

El NO producido por eNOS está bien establecido como una molécula pro-angiogénica, crucial para mantener un adecuado tono vascular e importante en la angiogénesis fisiológica. El vínculo entre la angiogénesis y la producción de NO fue sugerido a partir de la observación de la presencia de vasculitis en la angiogénesis (70). La inhibición farmacológica y la disrupción genética de eNOS limitan la angiogénesis durante la reparación tisular. La adición de donadores de NO promueve la angiogénesis y acelera el proceso de cicatrización en heridas (71-73). Durante la angiogénesis, el NO ha demostrado estimular la proliferación y migración de células endoteliales en forma dependiente de cGMP. Sin embargo, a altas concentraciones el NO inhibe respuestas angiogénicas, a través de la fosforilación de PKC, ERK, y c-Jun (74, 75).

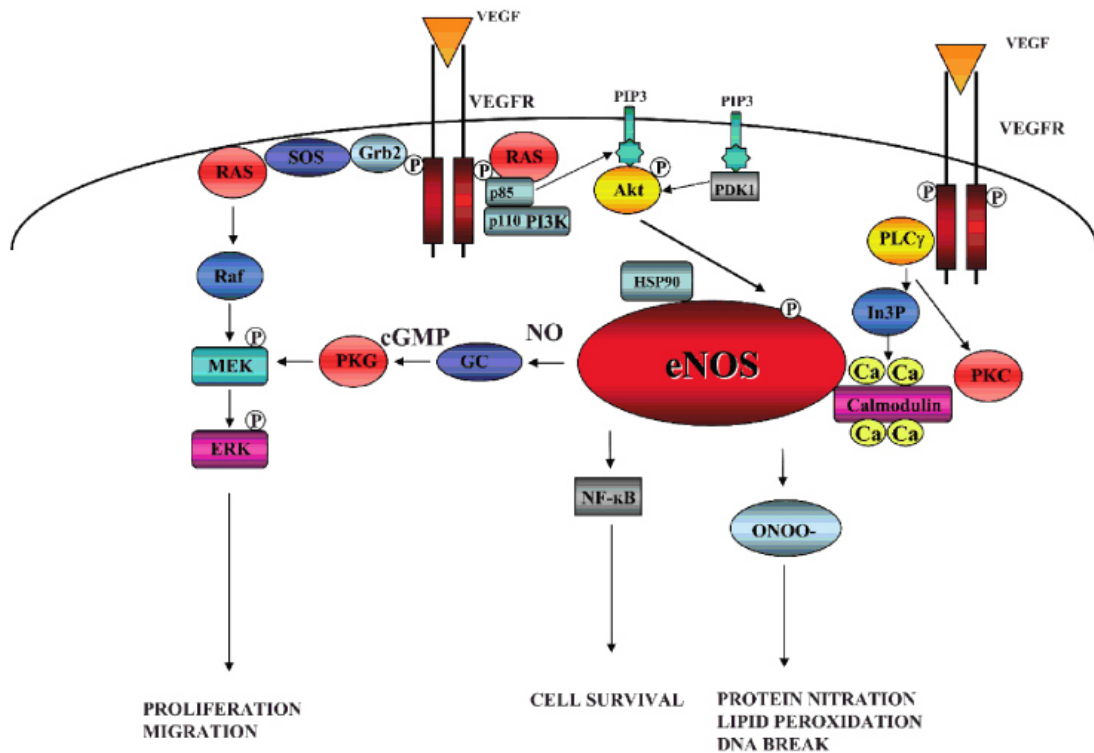
eNOS es regulado positivamente durante el proceso de hipoxia (76, 77). VEGF (inducido por hipoxia) regula en forma positiva la expresión de NO en células endoteliales y la expresión de eNOS. A su vez, eNOS modula la angiogénesis en respuesta a la isquemia tisular (71, 78, 79).

Los inhibidores de NO, como el N-nitro-L-arginina metilester (L-NAME), bloquean los efectos de VEGF. Además, se ha reportado que el proceso de angiogénesis es atenuado cuando la actividad de NO se reduce (79). La administración de anticuerpos anti-VEGFR-2 en modelos murinos causa una marcada reducción en la expresión de sintasas constitutivas de óxido nítrico, causa hipertensión y afecta la capacidad para generar NO (78). El NO actúa como un inhibidor de apoptosis de células endoteliales,

incrementa la migración endotelial aumentando la expresión de integrinas, la disociación de la matriz extracelular y estimulando la podocinesis (79).

Es así, que con estos antecedentes, se ha logrado crear un vínculo entre el NO y el VEGF en el proceso de angiogénesis.

**Fig. 10.** Participación de eNOS en la angiogénesis.



Los puntos en los que se conoce la participación de eNOS en las vías del desarrollo de angiogénesis han sido descritos y esquematizados (Morbidelli *et al.* 2008) (80).

Debido a la expresión de eNOS en tejido endotelial de vasos sanguíneos y su relación en la expresión de VEGF, podría ser un útil indicador de si el proceso de angiogénesis se está llevando a cabo en una determinada condición.

Anteriormente, se ha estudiado el efecto del NO en el desarrollo experimental de actinomicetoma, al bloquear la producción de dicha molécula por aminoguanidina y al utilizar ratones parcialmente bloqueados en la expresión de eNOS. El bloqueo químico de NO protege a los ratones del desarrollo de la enfermedad tras la infección por *N. brasiliensis*. Comparando la evolución clínica con ratones WT, los ratones heterocigotos para eNOS +/- no presentaron desarrollo del micetoma, demostrando que el bloqueo parcial de eNOS confiere protección contra el desarrollo del actinomicetoma causado por *N. brasiliensis* (81, 82).

Los resultados anteriores sugieren que el proceso de angiogénesis puede estar involucrado en el desarrollo del actinomicetoma, por lo que se ha preguntado si el uso de fármacos capaces de inhibir la expresión del factor pro-angiogénico más importante, VEGF, sea capaz de evitar el desarrollo de la lesión.

## 1.14 Fibratos.

Los fibratos son una clase de fármacos efectivos en disminuir niveles elevados de triglicéridos y colesterol en plasma (83), entre los que se encuentran el fenofibrato, clofibrato, bezafibrato y ciprofibrato (84, 85). Esta clase de fármacos son agonistas ligandos del receptor activador de la proliferación de peroxisomas alfa (PPAR $\alpha$ ) (38, 39). PPAR $\alpha$ , además de PPAR $\beta/\delta$  y PPAR $\gamma$ , forma parte de una familia de receptores nucleares que tras su unión con ligandos específicos modulan factores de transcripción, y son importantes en el metabolismo de glucosa y lípidos, por lo que son parte importante en el tratamiento de diabetes e hiperlipidemia (38, 39, 86).

Los PPAR $\alpha$  activados por la unión de sus agonistas ligandos controlan el metabolismo de lípidos (38, 39, 85-87), son expresados sobre células epiteliales en diferentes órganos, como hígado, riñón, músculo, y también en células endoteliales que conforman los vasos sanguíneos. Cuando las moléculas agonistas se unen a este receptor, es activado y forma heterodímeros con el receptor de ácido retinóico, formando un complejo que se une a un sitio específico en la región promotora de sus genes blanco, modulando así factores de transcripción que participan en la disminución de triglicéridos y colesterol en plasma, y en la disminución de la producción de citocinas pro-inflamatorias y reclutamiento de leucocitos (38, 85-87).

Los fibratos reducen el desarrollo de aterosclerosis y la inflamación a nivel de la pared celular debido a que previenen la secreción de IL-6 inducida por IL-1. IL-6 se ha localizado en lesiones ateroscleróticas, contribuyendo en la formación de células



espumosas y la proliferación de células musculares lisas; esta citocina controla la activación de macrófagos y células T, la migración de células y regula la respuesta de la fase aguda. IL-6 es considerada como el mejor marcador de la inflamación vascular. Delivery *et al.* han reportado la disminución de la concentración plasmática de otras citocinas inflamatorias, como TNF- $\alpha$ . Otros estudios han indicado la interacción de PPAR en diferentes vías de señalización para el desarrollo de respuestas inflamatorias, tales como el factor nuclear- $\kappa$ B, la proteína-1 activadora, y las señales de transducción y activadoras de la transcripción (88-91). También se ha sugerido el control de la inflamación a través de la regulación de la transcripción de VEGFR2 por los agonistas de PPAR $\alpha$  (92).

Se ha demostrado a través de la investigación en modelos experimentales de tumores que los fibratos, como ligandos de PPAR inhiben la migración y proliferación de células de endotelio vascular, e induce la apoptosis celular, debido a que estos agonistas inhiben la producción de VEGF, y con ello el proceso de angiogénesis (39, 83-85, 87).

#### **1.14.1 Fenofibrato.**

El fenofibrato es un compuesto orgánico perteneciente a la clase de bencenos y derivados sustituidos, y a la subclase de las benzofenonas, los cuales contienen grupos cetona unidos a dos grupos fenilo. El metabolito activo del fenofibrato es el ácido fenofíbrico. Como se mencionó anteriormente, es uno de los fármacos empleados en la

terapia adyuvante para reducir niveles elevados de colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad), colesterol total, triglicéridos, Apo B (apolipoproteína B) e incrementar los niveles de colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidad) y apoproteínas apoAI y apoAII, en pacientes adultos con hipercolesterolemia primaria o dislipidemia mixta (93).

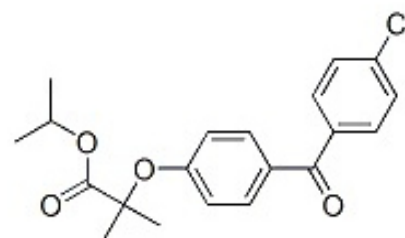
### 1.14.2 Propiedades fisicoquímicas del fenofibrato.

El fenofibrato (Fig. 11) posee una apariencia sólida, cristalina, insoluble en agua y soluble en compuestos orgánicos (tabla 7). Su peso molecular es de 360 g/mol y su fórmula molecular es  $C_{20}H_{21}ClO_4$ . Posee un punto de fusión de  $80.5^{\circ}C$ , y un punto de ebullición de  $469.77^{\circ}C$  a una presión de 760 mmHg. Su densidad es de  $1.18 \text{ g/cm}^3$ , y su índice de refracción ( $n_D^{20}$ ) es de 1.55 (93).

**Tabla 7.** Solubilidad del fenofibrato.

Solvente	Solubilidad
Acetona	15 mg/ml
Éter	15 mg/ml
DMSO	15 mg/ml
DMF	30 mg/ml
Etanol	1 mg/ml
Benceno	0.25 mg/ml
Cloroformo	0.25 mg/ml
DMF:PBS (1:3 a pH 7.2)	0.25 mg/ml

**Fig. 11.** Estructura del fenofibrato.



### **1.14.3 Farmacología y mecanismo de acción del fenofibrato.**

La unión de su metabolito al PPAR $\alpha$  incrementa el proceso de lipólisis y la eliminación de partículas ricas en triglicéridos circulantes en plasma, mediante la activación de la lipoprotein lipasa. Este efecto sobre los triglicéridos provoca alteraciones en el tamaño y composición de LDL, desde partículas densas y pequeñas, hasta partículas grandes flotantes. Estas últimas partículas poseen gran afinidad hacia los receptores de colesterol y son rápidamente catabolizadas (93).

Este medicamento se absorbe a través del tracto gastrointestinal y es excretado a través de la orina, principalmente en forma de ácido fenofíbrico y glucurónido de ácido fenofíbrico. Posee una vida media de 20 h en el organismo, y la dosis letal media (LD<sub>50</sub>) reportada en ratones es de 1600 mg/kg. El valor reportado de EC<sub>50</sub> (la concentración plasmática requerida de un agonista para obtener el 50% de un máximo efecto *in vivo*) en ratones es de 18  $\mu$ M, mientras que el valor reportado en humanos es de 30  $\mu$ M (93).

### **1.14.4 Fenofibrato y expresión de VEGF.**

Una comparación entre los fármacos de la clase de los fibratos demostró que el fenofibrato es el más potente en suprimir la proliferación de líneas tumorales e inhibir la proliferación y migración de células endoteliales inducidos por VEGF (39). Se ha revelado que la formación de la red de capilares dirigida por VEGF se atenúa en forma

importante con agonistas de PPAR $\alpha$  (92). También se ha encontrado que la administración de fenofibrato en pacientes con enfermedades coronarias reduce los niveles de mediadores inflamatorios en plasma (94).

Además, se ha demostrado su capacidad de inhibir la proliferación de células endoteliales inducida por otros factores angiogénicos. En altas concentraciones incrementa la apoptosis, inhibe la migración de células endoteliales en modelos de cicatrización de heridas, la formación de tubos capilares *in vitro*, y el proceso de angiogénesis *in vivo* (95).

Se ha encontrado que el fenofibrato sobre cultivos de células tumorales regula la transcripción de factores importantes en el proceso de apoptosis celular. *In vivo*, el fenofibrato disminuye la velocidad del crecimiento de tumores e induce apoptosis con un buen perfil de seguridad en modelos murinos de cáncer de mama (96). Otras vías se han dado a conocer tratando de explicar los efectos del fenofibrato en la supresión del crecimiento y proliferación celular en determinados tipos de cáncer, como linfomas de células B, gliomas y carcinomas (97-101). Investigaciones actuales continúan proponiendo las vías de señalización de la angiogénesis en las que interactúa el fenofibrato.

## **Capítulo II**

### **Definición del problema y Justificación**

La patogenia del micetoma no se conoce por completo, por lo que es necesario evaluar el papel de la angiogénesis en esta enfermedad. Los tratamientos actualmente disponibles son tóxicos, no siempre efectivos y costosos. Los resultados de este trabajo pueden dar lugar a investigaciones dedicadas a encontrar nuevas alternativas terapéuticas, debido a que en la mayoría de los casos los pacientes acuden por atención médica en estadios avanzados de la infección, donde la amputación de la parte afectada es el único tratamiento posible.

## Capítulo III

### Hipótesis

La angiogénesis es necesaria para el desarrollo del actinomicetoma experimental por *N. brasiliensis*.

## Capítulo IV

### Objetivos

#### 4.1 Objetivo general.

- Evaluar el papel de la angiogénesis en la patogenia del actinomicetoma experimental por *N. brasiliensis*.

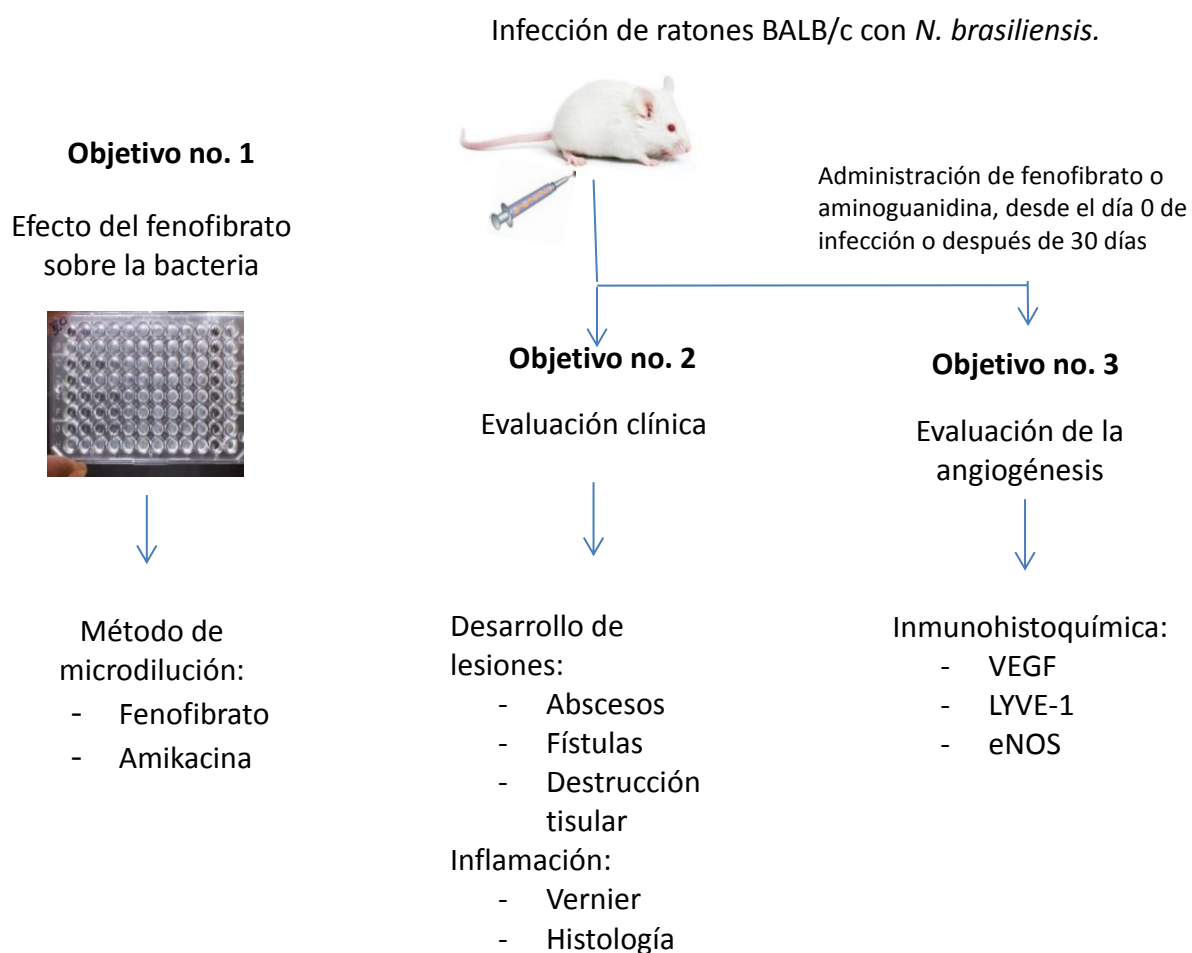
#### 4.2 Objetivos particulares.

1. Determinar el efecto del fenofibrato *in vitro* sobre la viabilidad de *N. brasiliensis*.
2. Determinar el efecto del fenofibrato sobre la evolución del actinomicetoma experimental en ratones BALB/c.
3. Evaluar la angiogénesis en un modelo experimental de actinomicetoma en ratones tratados con fenofibrato.

## Capítulo V

### Materiales y métodos

#### 5.1 Estrategia experimental.



**Fig.12.** Estrategia experimental.



## **5.2 Cepa de ratones BALB/c.**

Los ratones con los cuales se trabajaron en este proyecto provienen de la cepa donada por Carl Hansen del Instituto Nacional de Salud (NIH, BethesdaMa), a los cuales se les proporcionó alimento comercial (Purina) y agua estéril *ad libitum*. Los protocolos de cuidado e infección de animales se desarrollaron de acuerdo a las regulaciones internacionales (International Review Board) y mexicanas (NOM-062-ZOO-1999), aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario ‘José Eleuterio González’ de la U.A.N.L.

## **5.3 *N. brasiliensis*.**

La cepa empleada en este proyecto fue *N. brasiliensis* HUJEG-1, registrada en el ATCC con el número 700358. Esta bacteria fue obtenida del Departamento de Dermatología del Hospital Universitario ‘José Eleuterio González’, de un paciente al que se le diagnosticó con micetoma. La cepa se mantiene en agar BHI, a 37°C.

## **5.4 Modelo experimental de actinomicetoma.**

Se infectaron ratones BALB/c hembras de más de 12 semanas de edad con la cepa de *N. brasiliensis* HUJEG-1. La bacteria fue cultivada en caldo BHI e incubada durante 72 h a 37°C. La biomasa fue recuperada y homogeneizada con Potter-Evelham

para obtener una suspensión bacteriana con una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/ml, ajustada mediante nefelometría y confirmada por el método de cuenta viable. Del inóculo, 0.1 ml fueron inyectados en la pata trasera izquierda del ratón.

### **5.5 Administración del tratamiento.**

Tras la infección, los ratones fueron divididos en grupos a los cuales se les administraron diferentes tratamientos para evaluar su efecto durante el establecimiento del actinomicetoma y sobre el actinomicetoma establecido, administrándolo a partir del día cero y a partir del día 30 de infección, respectivamente. Los tratamientos consistieron en la administración de una suspensión de fenofibrato a una dosis de 200 mg/kg (39), vía orogástrica, cada 24 h durante 45 días, y hemisulfato de aminoguanidina (Sigma Chemical Co., St. Louis) al 2% en el agua purificada que tomaron *ad libitum* durante 45 días. Los ratones bajo este último tratamiento descrito fueron utilizados como un control en la inhibición del actinomicetoma (81). Se incluyeron también grupos de ratones a los cuales no se les administró ningún tratamiento, permitiéndoles desarrollar la infección natural.

### **5.6 Evaluación clínica.**

La formación de las lesiones características del actinomicetoma en el modelo experimental fue evaluada en cada grupo, buscando diferencias en su aparición a lo

largo del tiempo de tratamiento para evaluar el efecto del medicamento en la evolución de la infección. Se tomaron medidas de la lesión con un vernier, utilizadas para calcular la inflamación en  $\text{cm}^3$  empleando la ecuación elipsoidea (ancho x alto x altura de la pata, multiplicando el producto por el factor 0.5235999). También se consideraron los criterios descritos por Salinas-Carmona *et al.* (Tabla 4) para clasificar la lesión del actinomicetoma.

## **5.7 Sacrificio de animales.**

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical siguiendo las indicaciones de la NOM-062-ZOO-1999, a los días de tratamiento 0, 7, 15, 30 y 45 de cada grupo.

## **5.8 Inmunohistoquímica.**

### **5.8.1 Preparación de la muestra.**

El micetoma fue obtenido por la incisión de la unión entre la tibia y el fémur. El tejido fue colocado en formaldehído al 3.7% en PBS 1X durante 18-48 h a temperatura ambiente. Tras un proceso de descalcificación con ácido fórmico al 8% y ácido clorhídrico al 8%, en partes iguales, con recambios cada 24 h durante 7-8 días, la muestra fue deshidratada e incluida en parafina (punto 5.8.1.1). A partir de los bloques

de tejido se realizaron cortes de 3 a 4  $\mu\text{m}$ , montados sobre laminillas cargadas con poli-L-lisina (Fischer Scientific Co). Los cortes montados fueron desparafinizados tal cómo se describe en el punto 5.8.1.2. Para la tinción mediante inmunohistoquímica (punto 5.8.1.3) se utilizaron anticuerpos dirigidos contra VEGF (Abcam ab46454), LYVE1 (Abcam ab33682), y eNOS (610297 BD). Como control de isotipo se empleó el anticuerpo IgG de conejo (Abcam ab172730) y suero de ratones BALB/c. Se utilizó el anticuerpo secundario biotilnado dirigido contra conejo del kit Vectastain® ABC (sk-4001) para los anticuerpos anti-VEGF y LYVE-1. Para el anticuerpo anti-eNOS, se utilizó el anticuerpo secundario Goat anti-Mouse IgG H&L conjugado con peroxidasa de rábano (Abcam ab97023). Para revelar las tinciones se empleó el kit ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrate (sk-4105). El medio de montaje utilizado fue Vectamount Permanent kit (Vector H-5000). Se realizaron contratinciones con hematoxilina (punto 5.8.1.4).

#### **5.8.1.1. Deshidratación e inclusión del tejido en parafina.**

Tras el proceso de fijación, el tejido fue deshidratado de la siguiente forma: dos cambios de etanol al 70% de 1 h cada uno, un cambio etanol al 80% durante 1 h, un cambio de etanol al 95% duante 1 h, tres cambios de etanol absoluto de 90 min cada uno, tres cambios de xilol de 90 min cada uno, dos cambios de parafina de 2 h cada uno a 50-60°C. El tejido fue incorporado en moldes para obtener un bloque de parafina. Para separar el bloque del tejido a partir de su molde, la preparación se colocó a -20 °C al menos durante 20 minutos.

### **5.8.1.2. Desparafinización de tejido montado sobre laminillas.**

Las laminillas fueron colocadas en la estufa a 55°C, durante 30 min. Tras atemperar las laminillas, fueron colocadas en xileno, tres cambios de 10 min cada uno, dos cambios de etanol absoluto de 3 min cada uno, un cambio de etanol al 95% durante un min, un cambio de etanol al 80% durante un min, un cambio de etanol al 70% durante un min, enjuagando finalmente con agua destilada.

### **5.8.1.3. Técnica inmunohistoquímica.**

El desenmascaramiento de antígenos se realizó sumergiendo las laminillas de trabajo en buffer de citrato de sodio a pH 6 durante 20 min, precalentado previamente hasta una temperatura constante entre 90 y 95 °C. Después de dejar enfriar el buffer con las laminillas aún sumergidas, estas fueron colocadas en solución de lavado, 3 veces durante 3 min cada una. Para el bloqueo de la actividad de la peroxidasa, la sección del tejido fue cubierta con solución de peróxido de hidrogeno al 3% durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, las laminillas fueron colocadas en solución de lavado, 3 veces durante 3 min cada una. El bloqueo de los sitios inespecíficos se realizó colocando solución con albúmina sérica bovina, suero y gelatina de pescado durante 30 min a temperatura ambiente (anexo I-7). Tras eliminar el exceso de solución de bloqueo, se añadió el anticuerpo primario de interés a la dilución indicada en la tabla 8. La preparación fue incubada toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Las laminillas fueron colocadas en solución de lavado, 3 veces durante 3 min cada una. El anticuerpo secundario para VEGF y LYVE-1 fue colocado según las instrucciones del kit ABC

Vectastain PK-4001 (anexo I-10). Las soluciones de trabajo de este kit añadidas al tejido se incubaron durante 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario para eNOS fue colocado a la preparación a una dilución 1:300 en buffer PBS 1X pH 7.4, incubando en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 min. Terminado el tiempo de incubación, las laminillas fueron enjuagadas en solución de lavado, 3 veces durante 3 min cada una. El revelado de las reacciones se realizó incubando la preparación con la solución sustrato-cromógeno del kit Impact DAB a temperatura ambiente a los tiempos indicados en la tabla 8. La reacción de revelado es detenida con solución de lavado. Finalmente, las laminillas fueron enjuagadas en solución de lavado, 3 veces durante 3 min cada una.

**Tabla 8.** Condiciones de trabajo para los anticuerpos empleados.

Anticuerpo	Buffer	Concentración	Dilución	Compañía	Control positivo	Tiempo de revelado
VEGF	TBS	1 µg/ml	1:1000	Abcam	Riñón	3.30 min
LYVE-1	TBS	1 µg/ml	1:400	Abcam	Ganglio	8 min
eNOS	PBS	1.25 µg/ml	1:100	BD	Riñón	3.30 min

#### **5.8.1.4 Contratinción con hematoxilina.**

Las preparaciones fueron colocadas en solución de hematoxilina de Gill durante 5 min. Las laminillas fueron enjuagadas de forma suave y rápida por inmersión en alcohol-ácido al 1% y se colocaron de forma inmediata en agua amoniacal al 2% durante 1 min. El tejido fue deshidratado sumergiendo las laminillas en etanol al 80%,

realizando dos cambios de 1 min cada uno; un cambio de etanol al 95% durante 1 min, y dos cambios de etanol absoluto de 1 min cada uno. Posteriormente, las laminillas se colocaron en xilol durante 6 min. Por último, una gota de medio de montaje fue añadida con un aplicador de madera al tejido, y encima un cubreobjetos limpio, evitando la formación de burbujas.

### **5.9 Tinciones histológicas.**

A partir de los tejidos embebidos en parafina se obtuvieron cortes de 3 a 4  $\mu\text{m}$  de grosor y fueron teñidos con hematoxilina y eosina. Tras la desparafinización del tejido las laminillas fueron colocadas en hematoxilina de Gill durante 5 min. Fueron enjuagadas rápidamente en alcohol-ácido al 1% e inmediatamente se colocaron en agua amoniacal al 2% durante 1 min. Posteriormente, las laminillas fueron colocadas en eosina durante 4 min. El tejido fue deshidratado sumergiendo las lamillas en dos cambios de etanol al 80%, de 1 min cada uno, seguido de etanol al 95% durante 1 min y dos cambios de etanol absoluto de 1 min cada uno. Finalmente, las laminillas se colocaron en xilol durante 6 min. Se añadió una gota de medio de montaje sobre el tejido teñido y sobre la preparación se colocó un portaobjetos.

### **5.10 Análisis histológico.**

El análisis de cada una de las muestras teñidas se hizo en base a grados del 0 al 3 según la aparición de las lesiones, interpretando cada grado como porcentaje (0: 0-25%, 1: 26-50%, 2: 51-75%, 3: 76-100%). Para graficar los cambios observados por tiempo de

evaluación, los grados de lesión fueron sumados y promediados para cada grupo. La evaluación se realizó con ayuda de un patólogo como observador cegado a los tratamientos.

### **5.11 Análisis de Inmunohistoquímica.**

A partir de las tinciones con anticuerpos anti-VEGF y anti-eNOS, se contaron los vasos sanguíneos por campo, así como los vasos linfáticos con el marcaje de LYVE-1, a 20X en un microscopio de campo claro, en las zonas de mayor vascularización en dermis profunda. De cada tejido se contaron 8 campos, contando en total 72 campos por muestra (cada bloque de muestra estuvo conformada por tres tejidos y fueron realizados 3 cortes por bloque).

### **5.12 Microdilución en placa.**

Se siguieron las instrucciones para la evaluación de susceptibilidad a agentes antimicrobianos, descritos en el manual M24-A Vol. 23 No. 18, 2003, por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). A partir de un subcultivo de la cepa de *N. brasiliensis*, sembrada en agar sangre al 5% e incubada a 36°C durante 3 días, se recolectó la biomasa con un hisopo, la cual fue transferida a un tubo con agua estéril conteniendo perlas de vidrio. A partir de esta suspensión, tras haber disgregado las colonias con vórtex y dejado reposar, el sobrenadante de la suspensión libre de cúmulos



de la bacteria fue ajustado a la densidad equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland. El inóculo final empleado, con una concentración aproximada de  $5 \times 10^5$  UFC/ml, fue preparado transfiriendo 50  $\mu$ l de la suspensión a un tubo con 7.45 ml de caldo Mueller-Hinton, invirtiendo de ocho a diez veces la mezcla. Los pocillos de la placa de microtitulación estéril contenían 100  $\mu$ l del medio de cultivo, colocados en condiciones de esterilidad, sobre los cuales se hicieron las diluciones seriadas de los medicamentos a probar. Se empleó amikacina a un rango de 0.25 a 32  $\mu$ g/ml, como control positivo de inhibición, y fenofibrato a un rango de 0.75 a 96  $\mu$ g/ml. Fueron añadidos 100  $\mu$ l de la suspensión bacteriana con el ajuste final a cada uno de los pocillos. El stock de los fármacos a partir de los cuales se realizaron las diluciones en las placas se prepararon en caldo Mueller-Hinton. Las diluciones de los fármacos se realizaron por triplicado. El stock del fenofibrato fue preparado a partir de una solución en etanol al 80% (la concentración en la que se obtuvo mejor solubilidad del fenofibrato), a una concentración de 1 mg/ml. Previo al ensayo, se comprobó que el etanol al 80% no inhibe el crecimiento de la bacteria. La placa fue incubada a 35° C durante 72 h.

### **5.13 Análisis estadístico.**

Los datos de las medidas de inflamación y el conteo de vasos sanguíneos y linfáticos a diferentes tiempos por grupo fueron tratados con la prueba Kruskal – Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunns. Estos datos fueron graficados como el promedio  $\pm$  SEM.

## Capítulo VI

### Resultados

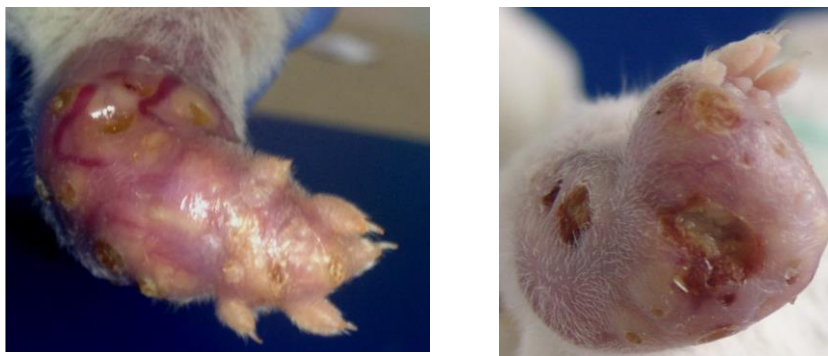
#### 6.1 Efecto del fenofibrato *in vitro* sobre la viabilidad de *N. brasiliensis*.

La cepa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 ATCC-700538 fue utilizada para evaluar el efecto del fenofibrato sobre la viabilidad de esta bacteria. Como control de inhibición del crecimiento se utilizó amikacina. Tras 72 h de incubación, la concentración mínima inhibitoria (CMI) de amikacina para *N. brasiliensis* fue de 2 µg/ml, mientras que el fenofibrato no ejerce ningún efecto sobre su crecimiento en ninguna de las concentraciones empleadas. La CMI se definió como la menor concentración del fármaco que a simple vista inhiba completamente el crecimiento del microorganismo en estudio. La interpretación de los resultados se realizó tomando como referencia el crecimiento observado en el pocillo usado como control positivo, el cual presenta una clara turbidez y el crecimiento característico de *Nocardia*. Dentro del rango de concentración empleado para fenofibrato se encontraba el valor de EC<sub>50</sub> en ratones (6 µg/ml).

## 6.2 Evaluación clínica.

### 6.2.1 Evaluación clínica del efecto del fenofibrato durante el establecimiento del actinomicetoma.

La evaluación clínica se realizó de forma macroscópica e histológica. La evaluación macroscópica consistió en buscar diferencias en las lesiones características del actinomicetoma experimental, tomando en cuenta la dilatación de vasos sanguíneos, probablemente relacionados con angiogénesis, abscesos, fibrosis, fístulas y úlceras (Fig. 13).



**Fig. 13.** Lesiones características del actinomicetoma experimental por *N. brasiliensis*.

Comparado con el grupo de infección natural, al día 30 se observó que bajo el tratamiento con fenofibrato hay un menor porcentaje de ratones en los que se desarrollan úlceras, fibrosis y dilatación de vasos sanguíneos, y de forma contraria un mayor número de ratones en los que se desarrollaron abscesos. No se observaron diferencias en la

aparición de fístulas. Como era de esperarse, en el grupo control de la administración de aminoguanidina no se desarrollaron las lesiones evaluadas macroscópicamente, a excepción de fístulas, las cuales desaparecen para el día 30 de tratamiento. Además, pudo apreciarse un retraso en la formación de abscesos (Tabla 9, Fig. 14).

**Tabla 9.** Evaluación del desarrollo de las lesiones durante el establecimiento del actinomicetoma experimental.

Tiempo Lesión	Sin tratamiento					Tratamiento con fenofibrato					Tratamiento con aminoguanidina				
	D0	D7	D15	D30	D45	D0	D7	D15	D30	D45	D0	D7	D15	D30	D45
Abscesos %	0	11	47	58	100	0	50	47	83	100	0	0	0	0	25
Úlceras %	0	6	47	40	38	0	22	7	7	14	0	0	0	0	0
Fístulas %	0	56	0	25	0	0	72	7	17	36	0	100	40	0	0
Dilatación de vasos sanguíneos %	0	0	0	0	50	0	0	0	0	36	0	0	0	0	0
Fibrosis %	0	0	20	20	50	0	0	7	7	14	0	0	0	0	0

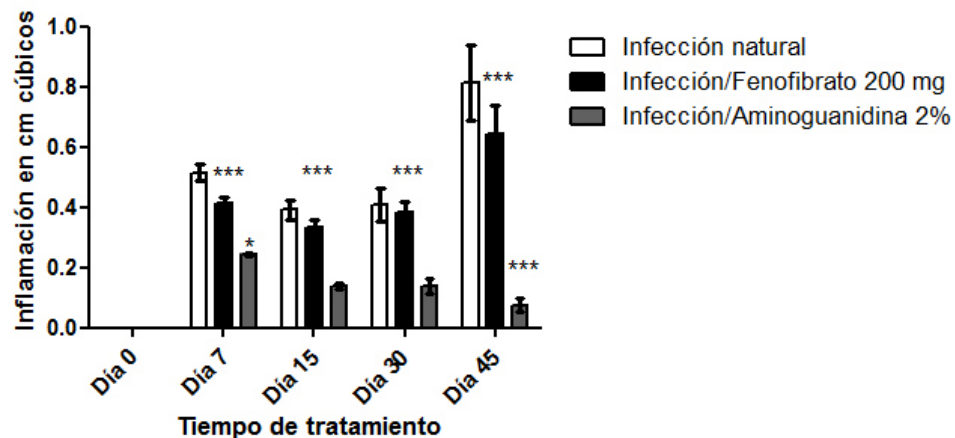
Tiempo en días de tratamiento. Evaluación expresada en porcentaje de ratones.



**Fig. 14.** Lesiones del actinomicetoma experimental durante el establecimiento de la enfermedad. Imágenes representativas de las lesiones de cada grupo al día 45 de

tratamiento. a): grupo de la infección natural, b): tratamiento con Fenofibrato, c): tratamiento con aminoguanidina.

Se observó una disminución significativa en las medidas de inflamación en todos los tiempos de evaluación en aquellos ratones a los cuales se les administró el fenofibrato, comparado con el grupo de la infección natural. Como era de esperarse, el grupo que recibió aminoguanidina mostró menor inflamación (Fig. 15).



**Fig. 15.** Efecto del fenofibrato y la aminoguanidina durante el establecimiento del actinomictoma experimental. Evaluación a diferentes tiempos, bajo cada tratamiento. Se expresa el promedio de las medidas por día de evaluación  $\pm$  SEM.

Siguiendo los criterios de la tabla 4, descritos por Salinas-Carmona *et al.*, el actinomictoma puede ser clasificado para ubicar el grado de la lesión y su progreso. En

este trabajo se observó que hay un retraso en la progresión de la lesión hacia el grado IV cuando se administra fenofibrato durante el establecimiento del actinomicetoma, en comparación con el grupo de la infección natural. La mayoría de los ratones bajo este tratamiento se ubican entre el grado II y III, lo cual se correlaciona con un mayor desarrollo de abscesos. El grupo que recibe aminoguanidina se mantiene siempre en el grado I de lesión, lo que indica inflamación mínima (Tabla 10).

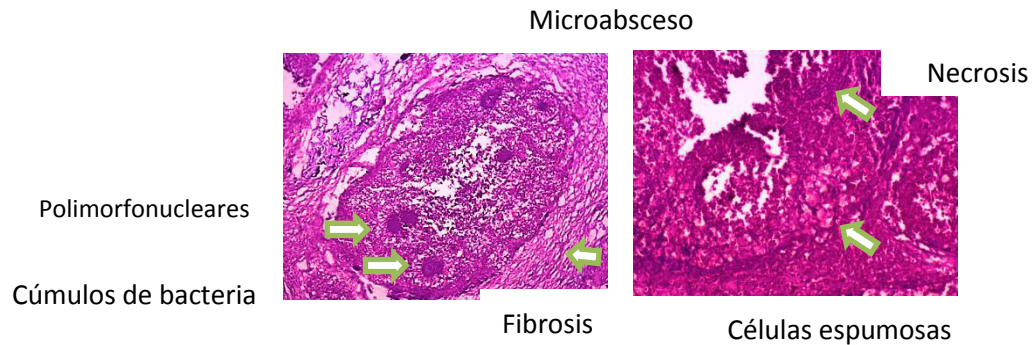
**Tabla 10.** Porcentaje de ratones en relación al grado de la lesión durante el establecimiento del actinomicetoma bajo tratamiento con fenofibrato o aminoguanidina.

Tiempo Grado	Sin tratamiento			Tratamiento con fenofibrato			Tratamiento con aminoguanidina		
	D0	D30	D45	D0	D30	D45	D0	D30	D45
I (%)	0	64	0	0	50	0	0	100	100
II (%)	0	36	25	0	50	40	0	0	0
III (%)	0	0	25	0	0	35	0	0	0
IV (%)	0	0	50	0	0	25	0	0	0

Se muestran los resultados de los días 0, 30 y 45 de cada tratamiento.

Tras la tinción con hematoxilina y eosina, se evaluaron diferencias en la formación de abscesos, conformados a su vez de infiltrado de células polimorfonucleares que rodean cúmulos de bacterias, células espumosas a la periferia y zonas de necrosis, delimitado por anillos de fibrosis; cambios vasculares, evaluando la formación de trombos sépticos, vasculitis, neuritis y perineuritis, y congestión vascular;

cambios tisulares, considerando paniculitis, edema y miositis; formación de úlceras y desarrollo de osteomielitis aguda, así como la formación de vasos sanguíneos (Fig.16 y 17).

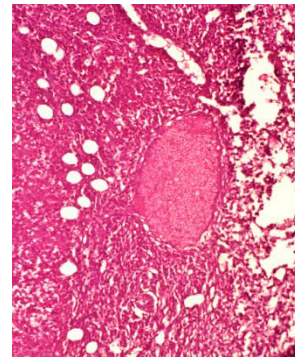


**Figura 16.** Formación de microabscesos en el actinomicetoma experimental. Imágenes representativas de las lesiones evaluadas en cada muestra.

En el análisis histológico se observó una disminución en el porcentaje de aparición de las lesiones en los ratones tratados con fenofibrato durante el establecimiento de la enfermedad, comparado con el grupo de la infección natural, entre los días 30 y 45. El 90% de las lesiones evaluadas aparecen en menor porcentaje; dichas lesiones corresponden a: la infiltración de células polimorfonucleares y células espumosas, la formación de microabscesos, miositis, edema, necrosis, úlceras, neuritis e inflamación perineural, trombos sépticos, vasculitis y congestión vascular (Fig. 18).

### Cambios vasculares

#### Vasculitis

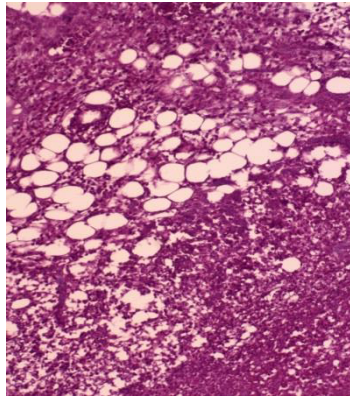


#### Trombos sépticos

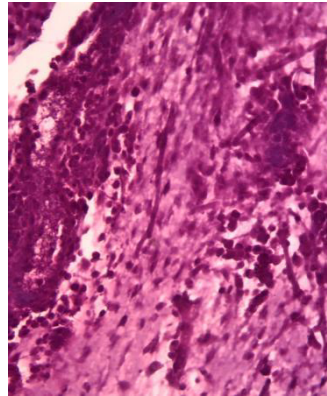
#### Neuritis y perineuritis

#### Congestión vascular

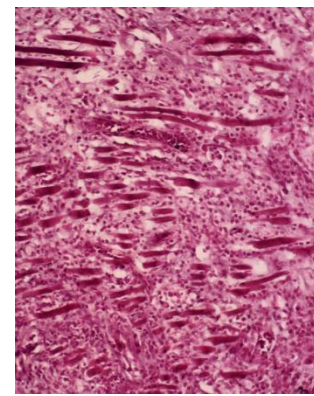
### Cambios tisulares



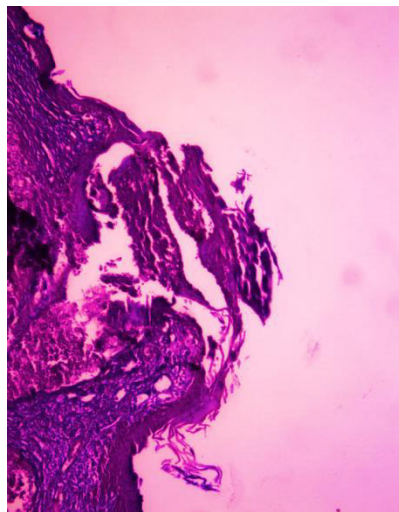
#### Paniculitis



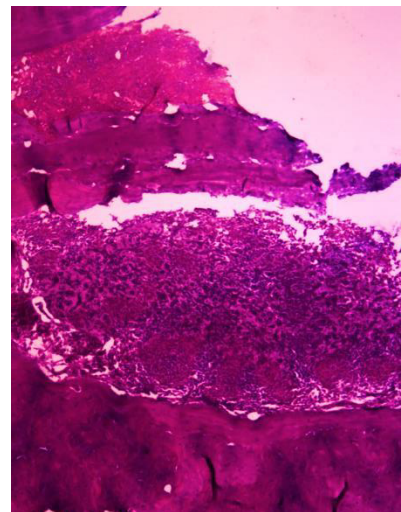
#### Edema



#### Miositis



#### Úlcera

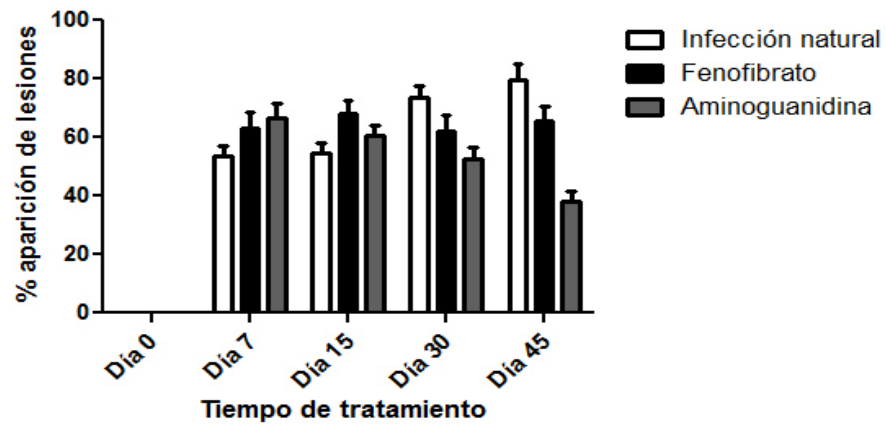


#### Osteomielitis aguda

**Fig. 17.** Cambios vasculares, tisulares y óseos en el actinomicetoma experimental.

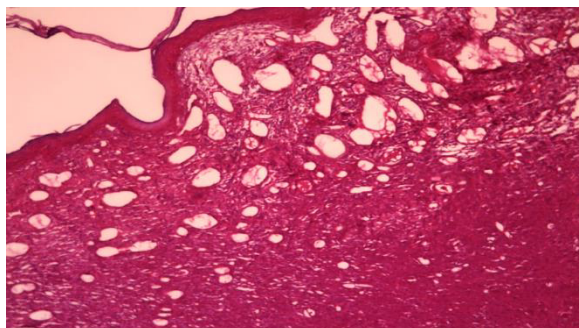
Imágenes representativas de las lesiones evaluadas en los tejidos bajo cada tratamiento.



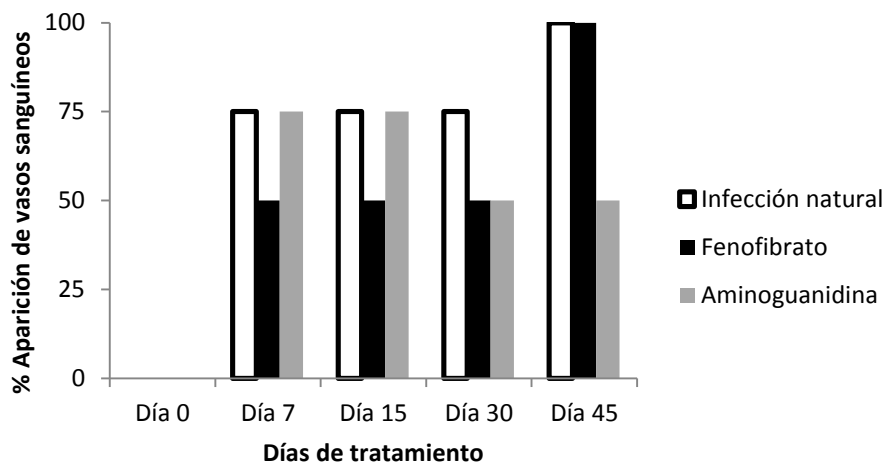


**Fig. 18.** Modificación de las lesiones durante el establecimiento del actinomicetoma experimental de ratones tratados con fenofibrato y aminoguanidina. Los resultados se expresan como porcentaje bajo cada tratamiento a diferentes tiempos de evaluación. Se graficó el promedio de los porcentajes por día de evaluación  $\pm$  SEM.

La formación de vasos sanguíneos fue evaluada por grados de aparición con la tinción de hematoxilina y eosina (Fig. 19), bajo diferentes tratamientos. La administración de fenofibrato durante el establecimiento del actinomicetoma provoca una disminución en el número de vasos al día 30, comparado con el grupo de la infección natural (Fig. 20).



**Fig. 19.** Desarrollo de angiogénesis en el actinomicetoma experimental. Imagen representativa de nuevos vasos sanguíneos en las muestras de tejido bajo diferentes tratamientos.



**Fig. 20.** Aparición de vasos sanguíneos durante establecimiento del actinomicetoma experimental en ratones tratados con fenofibrato y aminoguanidina. Los resultados se expresan como porcentaje del promedio de los vasos sanguíneos bajo cada tratamiento a diferentes tiempos de  $\pm$  SEM.

### 6.2.2 Evaluación clínica del efecto del fenofibrato sobre el actinomicetoma establecido.

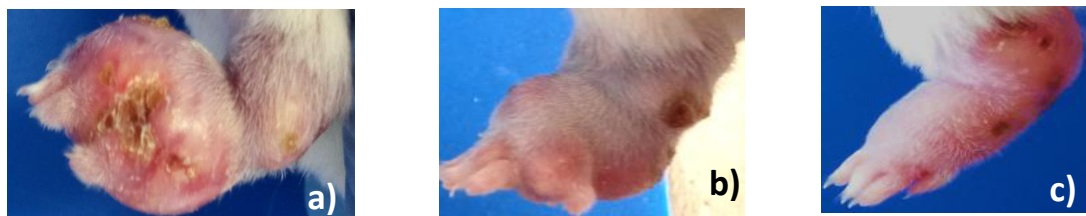
El progreso de las lesiones anteriormente consideradas en la evaluación clínica durante el establecimiento del micetoma fueron también observadas bajo la administración de diferentes tratamientos en ratones con micetoma establecido. Al día 45 de la administración de fenofibrato el número de lesiones como abscesos, úlceras y fístulas aparecen en un menor número de ratones, comparado con el grupo que no recibió ningún tratamiento. No se observan diferencias en fibrosis ni en dilatación de

vasos sanguíneos. Una vez más, se observó una regresión en las lesiones del grupo control al que se le administró aminoguanidina (Tabla 11, Fig. 21).

**Tabla 11.** Evaluación del desarrollo de las lesiones en ratones con actinomicetoma experimental establecido.

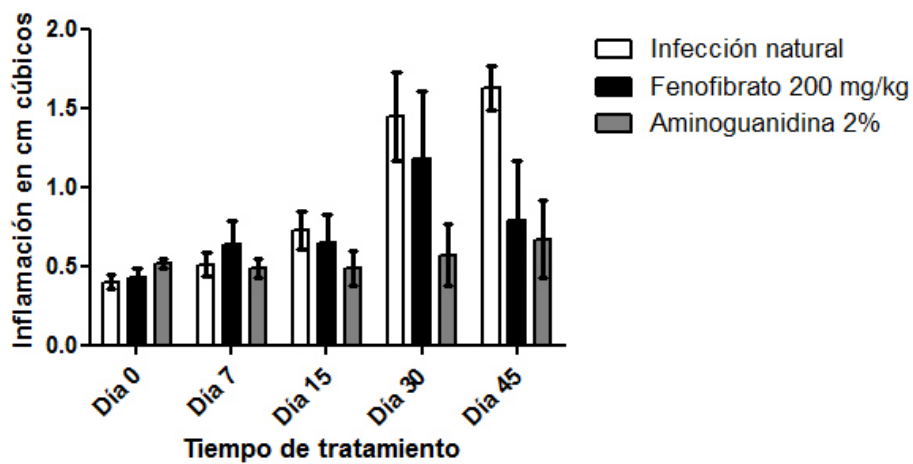
Tiempo Lesión	Infección natural					Fenofibrato					Aminoguanidina				
	D0	D7	D15	D30	D45	D0	D7	D15	D30	D45	D0	D7	D15	D30	D45
Abscesos %	64	73	73	90	90	76	82	70	70	60	94	93	75	40	20
Úlceras %	0	27	22	25	30	18	27	15	15	10	45	31	10	10	10
Fístulas %	28	27	33	60	60	20	24	36	30	30	29	31	38	10	0
Dilatación de vasos sanguíneos %	0	27	56	50	50	12	29	36	50	50	29	46	63	40	10
Fibrosis %	0	0	22	50	60	6	6	14	40	60	12	15	15	10	10

Tiempo en días de tratamiento. Evaluación expresada en porcentaje de ratones.



**Fig. 21.** Lesiones del actinomicetoma experimental establecido. Imágenes representativas de cada grupo al día 45 de tratamiento. a): grupo de la infección natural, b): tratamiento con fenofibrato, c): tratamiento con aminoguanidina.

A partir del día 30 de tratamiento con fenofibrato se observó una disminución en las medidas de inflamación, en comparación con los ratones del grupo de la infección natural, aunque no existen diferencias significativas. Las medidas de inflamación en el grupo que recibió aminoguanidina son menores que las medidas de los grupos anteriores (Fig. 22).



**Fig. 22.** Efecto del fenofibrato y la aminoguanidina en el actinomicetoma experimental establecido. Evaluación a diferentes tiempos, bajo cada tratamiento. Se expresa el promedio de las medidas por día de evaluación  $\pm$  SEM.

Según los criterios de Salinas-Carmona para evaluar la progresión de las lesiones, bajo el tratamiento con fenofibrato, aunque la mayoría de los ratones se ubicaban en un grado IV de micetoma, el resto se encontraba entre el grado II y III a diferencia del grupo de la infección natural ubicados en su totalidad en los grados III y

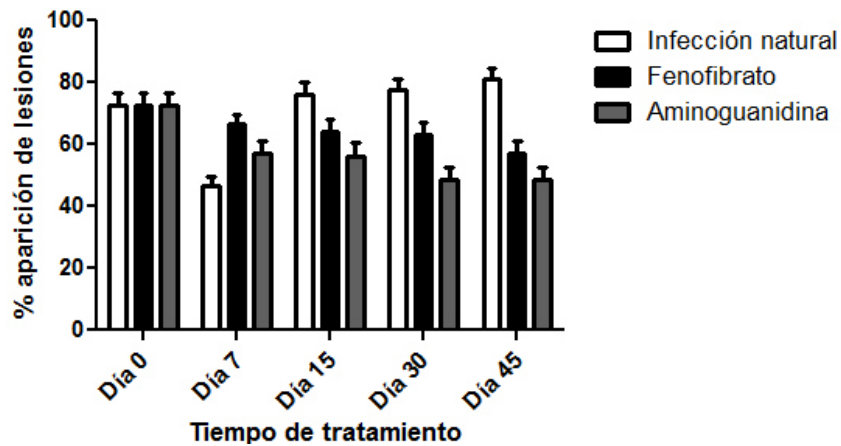
IV al día 45 de tratamiento. La mayoría de los ratones del grupo que recibió aminoguanidina se mantuvo en el grado II de progresión del micetoma (Tabla 12).

**Tabla 12.** Porcentaje de ratones en relación al grado de la lesión en el actinomicetoma establecido bajo tratamiento con fenofibrato o aminoguanidina.

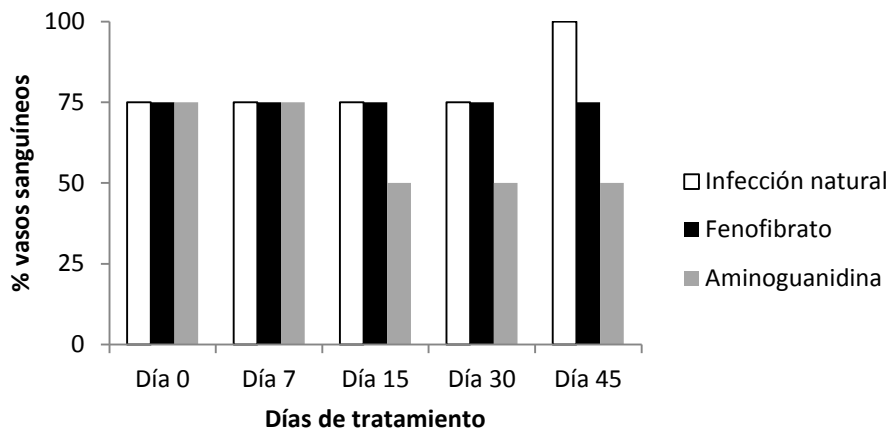
Tiempo Grado	Sin tratamiento			Tratamiento con fenofibrato			Tratamiento con aminoguanidina		
	D0	D30	D45	D0	D30	D45	D0	D30	D45
I (%)	75	0	0	63	0	0	18	0	0
II (%)	25	0	0	32	30	30	65	60	70
III (%)	0	50	40	0	30	10	5	20	30
IV (%)	0	50	60	5	40	60	12	20	0

Se muestran los resultados de los días 0, 30 y 45 de cada tratamiento.

Para el análisis histológico, se consideraron las mismas lesiones descritas en la evaluación histológica del tejido infectado bajo diferentes tratamientos administrados durante el establecimiento del micetoma. Se observó una disminución en el porcentaje de aparición de las lesiones en los ratones con micetoma establecido tratados con fenofibrato, comparado con el grupo de la infección natural entre los días 30 y 45. El 30% de las lesiones evaluadas aparecen en menor porcentaje; dichas lesiones corresponden a la infiltración de células espumosas, la formación de edema, paniculitis, úlceras, trombos sépticos, vasculitis y congestión vascular (Fig. 23). La administración de fenofibrato sobre el actinomicetoma establecido provoca una disminución en el número de vasos al día 45, comparado con el grupo de la infección natural (Fig. 24).



**Fig. 23.** Modificación de las lesiones en el actinomycetoma experimental establecido de ratones tratados con fenofibrato y aminoguanidina. Los resultados se expresan como porcentaje bajo cada tratamiento a diferentes tiempos de evaluación. Se graficó el promedio de los porcentajes por día de evaluación  $\pm$  SEM.

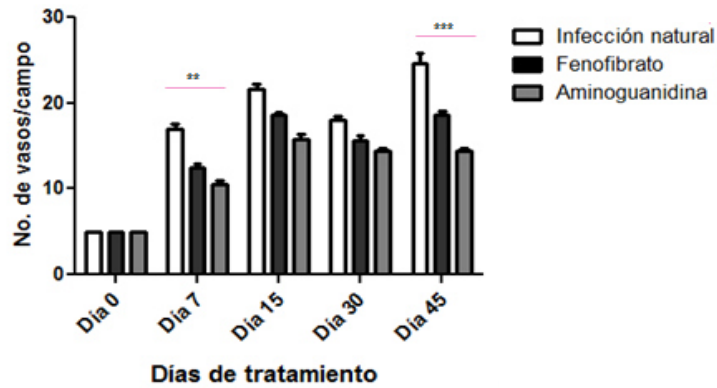


**Fig. 24.** Porcentaje de vasos sanguíneos en el actinomycetoma experimental establecido en ratones tratados con fenofibrato y aminoguanidina. Los resultados se expresan como porcentaje del promedio de los vasos sanguíneos bajo cada tratamiento a diferentes tiempos de  $\pm$  SEM.

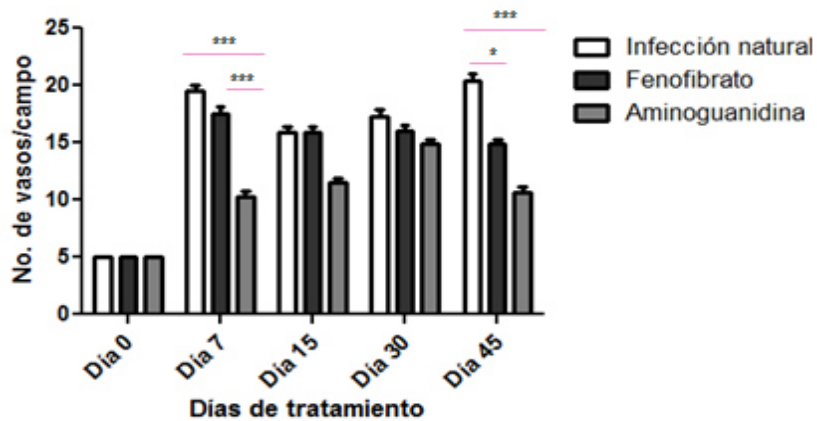
### **6.3 Evaluación de angiogénesis.**

#### **6.3.1 Evaluación de la angiogénesis bajo el tratamiento con fenofibrato durante el establecimiento del actinomicetoma.**

Se observó un incremento en el número de vasos sanguíneos conforme avanza el tiempo de infección en los ratones infectados. En ratones tratados con fenofibrato durante el establecimiento del micetoma se observó una disminución en el número de vasos sanguíneos por campo con el marcaje de VEGF y eNOS al día 45 de tratamiento (Fig. 25 y 26). Ambos marcajes se observaron alrededor de los vasos sanguíneos. Además, la expresión de VEGF se observó en células dentro de la zona de fibrosis y en el infiltrado celular del microabsceso (Fig. 27 y 28). eNOS se observó también en células de la periferia del microabsceso (Fig. 29 y 30). La cuenta de los vasos linfáticos con el marcaje de LYVE-1 no se correlaciona con la cuenta de los vasos sanguíneos (Fig. 31) . El marcaje de esta molécula se observa solamente alrededor de vasos linfáticos (Fig. 32). Las estructuras de los vasos se localizan en las zonas de fibrosis que rodean a los abscesos.

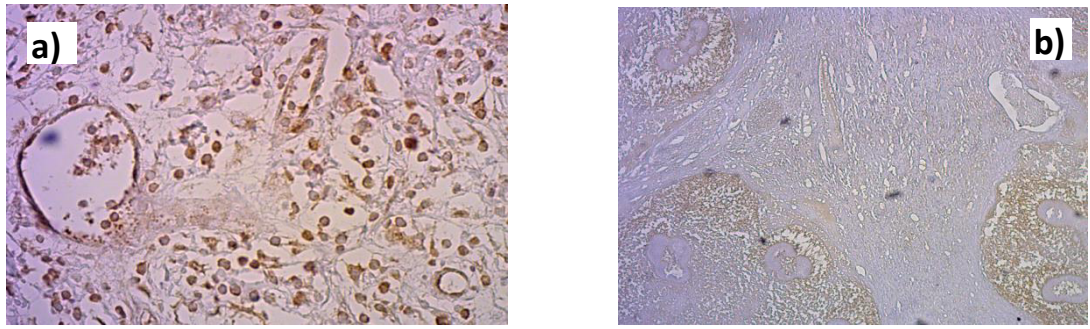


**Fig. 25.** Inmunoreactividad de VEGF en tejido infectado durante el establecimiento del actinomicetoma. Evaluación por grupo a diferentes tiempos. Los resultados se expresaron como el promedio de vasos sanguíneos por campo  $\pm$  SEM.

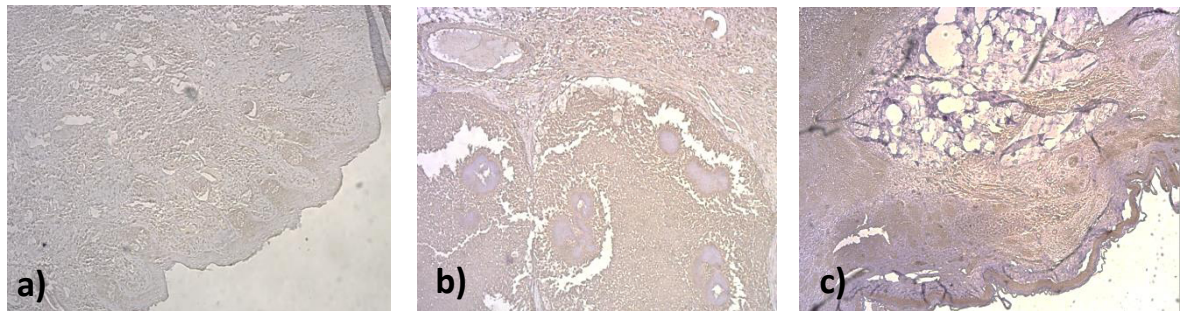


**Fig. 26.** Inmunoreactividad de eNOS en tejido infectado durante el establecimiento del actinomicetoma. Evaluación por grupo a diferentes tiempos. Los resultados se expresaron como el promedio de vasos sanguíneos por campo  $\pm$  SEM.

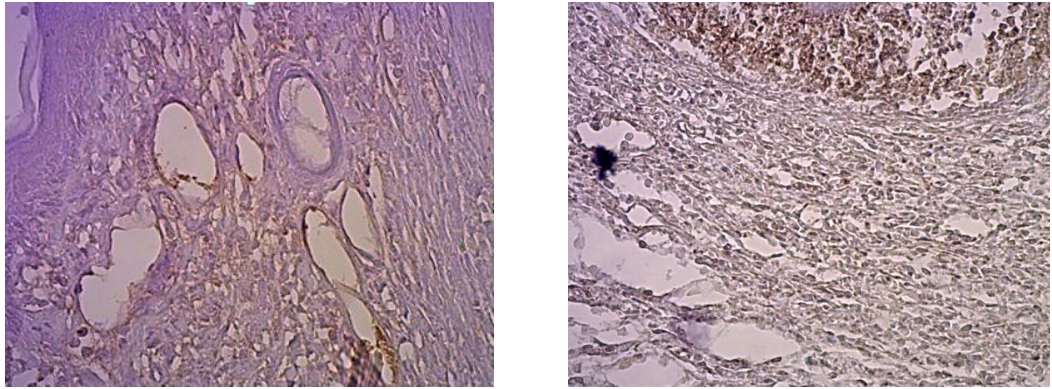




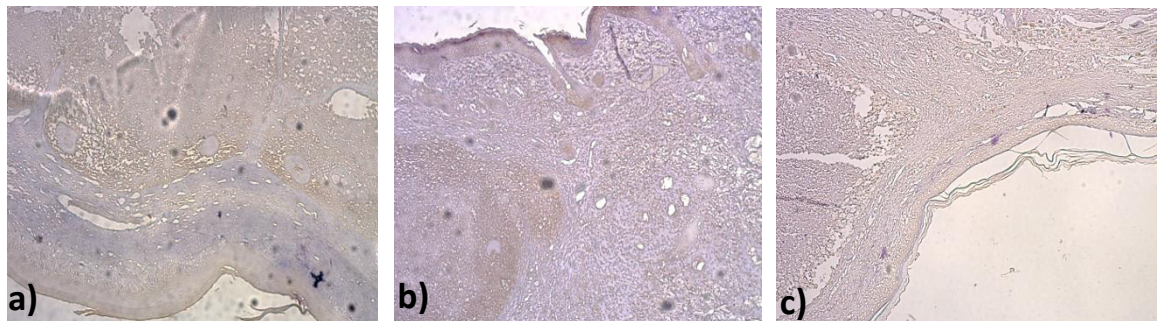
**Fig. 27.** Expresión de VEGF en tejido de actinomietoma. Imagen representativa de la expresión de VEGF en vasos sanguíneos, células de la zona de fibrosis y del infiltrado celular en el absceso. a): imagen captada a 10X, b): imagen captada a 40X.



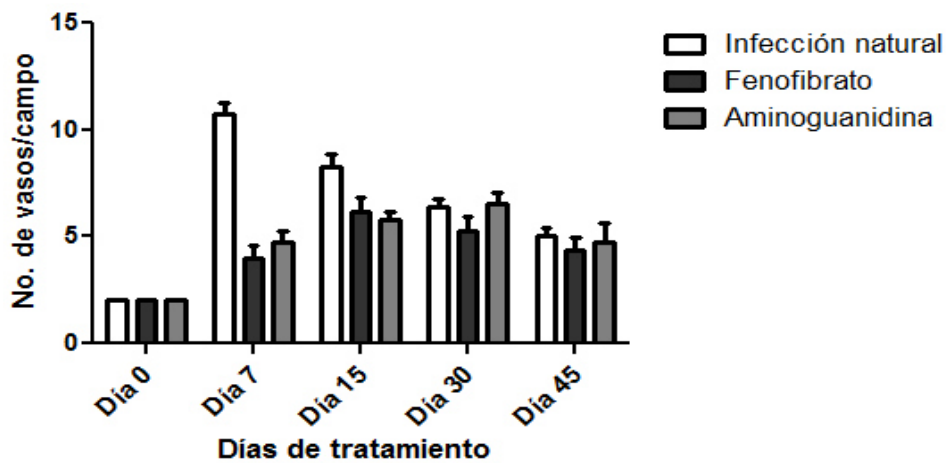
**Fig. 28.** Expresión de VEGF en tejido de actinomietoma durante el establecimiento de la enfermedad. Imagen representativa de la expresión de VEGF al día 45 de tratamiento. a): infección natural, b): tratamiento de fenofibrato, c): tratamiento de aminoguanidina. Imágenes captadas a 10X.



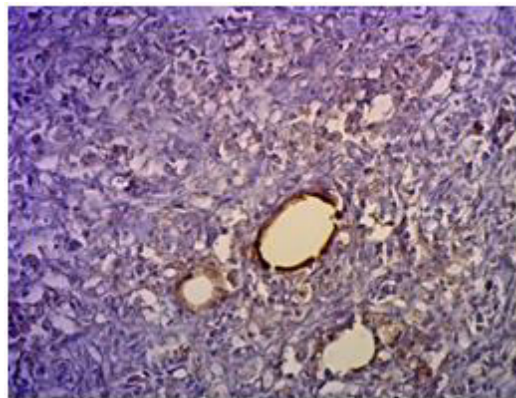
**Fig. 29.** Expresión de eNOS en tejido de actinomictoma. Imagen representativa de la expresión de eNOS en vasos sanguíneos, células de la zona de fibrosis y células en la periferia del micetoma. Imágenes captadas a 40X.



**Fig. 30.** Expresión de eNOS en tejido de actinomictoma durante el establecimiento de la enfermedad. Imagen representativa de la expresión de VEGF al día 45 de tratamiento. a): infección natural, b): tratamiento de fenofibrato, c): tratamiento de aminoguanidina. Imágenes captadas a 10X.



**Fig. 31.** Inmunoreactividad de LYVE-1 en tejido infectado durante el establecimiento del actinomicetoma. Evaluación por grupo a diferentes tiempos. Los resultados se expresaron como el promedio de vasos sanguíneos por campo  $\pm$  SEM.

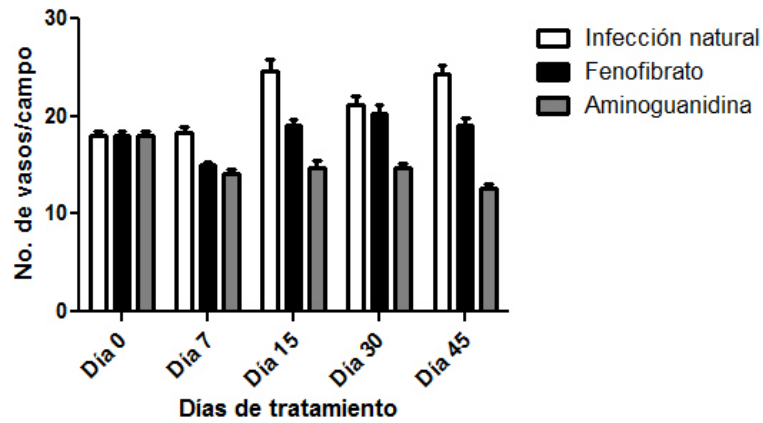


**Fig. 32.** Expresión de LYVE-1 en tejido de micetoma. Imagen representativa de la expresión de LYVE-1 en vasos linfáticos. Imagen captada a 40X.

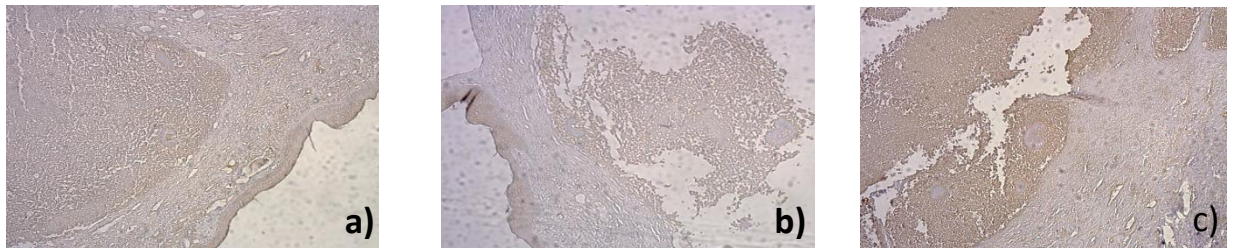
### **6.3.2 Evaluación de la angiogénesis bajo el tratamiento de fenofibrato sobre el actinomicetoma establecido.**

En el tejido con micetoma establecido se observó un incremento en el número de vasos sanguíneos y en el porcentaje de células inmunonreactivas con anti-VEGF (Fig. 33 y 34) a partir del día 15 de tratamiento (correspondiente al día 45 de la infección natural), y con anti- eNOS (Fig. 35 y 36) al día 45 de tratamiento (correspondiente al día 75 de infección natural). Al final del tiempo de evaluación las cuentas de vasos son similares con ambos marcadores. Con la administración de fenofibrato se observó una disminución en las cuentas de los vasos sanguíneos para VEGF y eNOS al día 45 de tratamiento. La expresión de VEGF se observó en células del endotelio de los vasos sanguíneos, células en la zona de fibrosis, y células infiltradas al absceso. eNOS es expresado en células de endotelio de vasos sanguíneos, células de la zona de fibrosis, y células a la periferia del microabsceso.

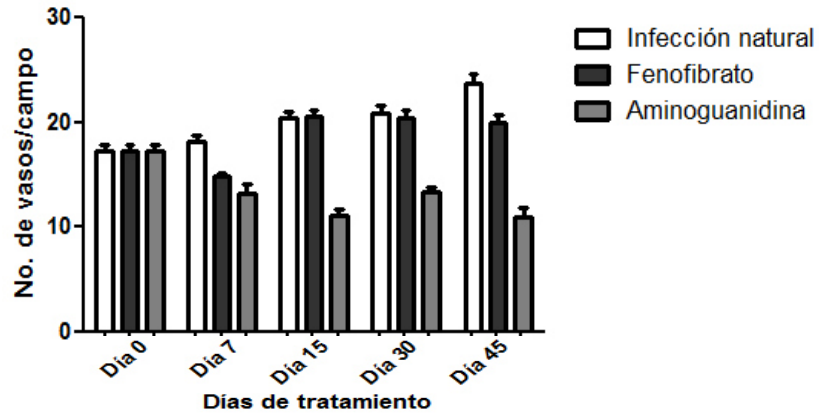
La cuenta de los vasos linfáticos con el marcaje de LYVE-1 es similar a la obtenida en la lesión durante el establecimiento del actinomicetoma. No existe una correlación en el número de vasos linfáticos con el número de vasos sanguíneos marcados con VEGF y eNOS (Fig. 37). LYVE-1 se observó expresado en endotelio de vasos linfáticos.



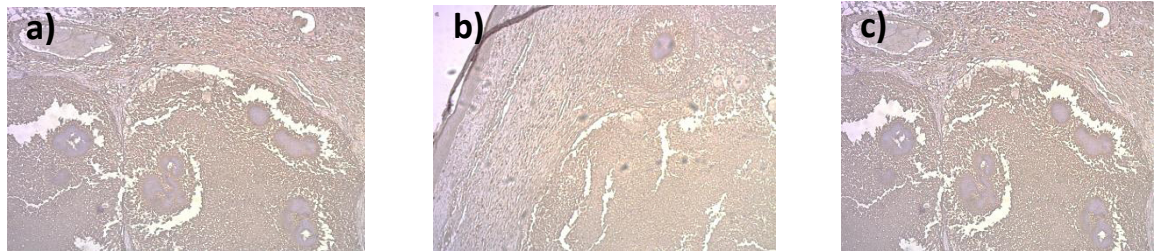
**Fig. 33.** Inmunoreactividad de VEGF en tejido con actinomictoma establecido. Evaluación por grupo a diferentes tiempos. Los resultados fueron expresados como el promedio de vasos sanguíneos por campo  $\pm$  SEM.



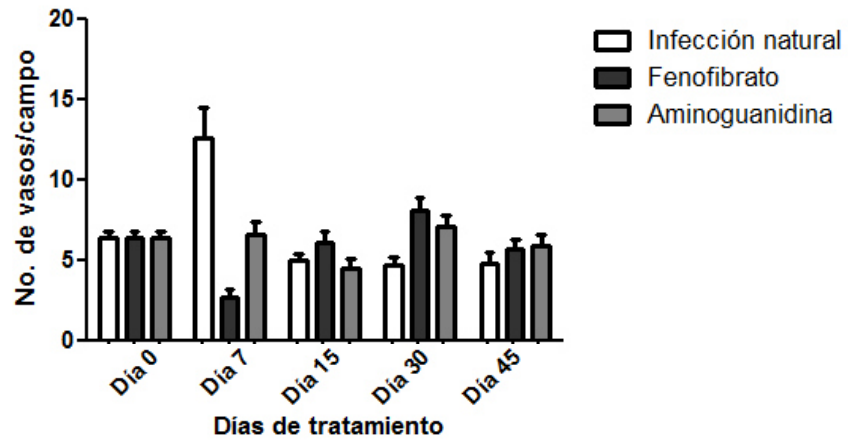
**Fig. 34.** Expresión de VEGF en tejido con actinomictoma establecido. Imagen representativa al día 45 de tratamiento. . a): infección natural, b): tratamiento de fenofibrato, c): tratamiento de aminoguanidina. Imágenes captadas a 10X.



**Fig. 35.** Inmunoreactividad de eNOS en tejido con actinomicetoma establecido. Evaluación por grupo a diferentes tiempos. Los resultados fueron expresados como el promedio de vasos sanguíneos por campo  $\pm$  SEM.



**Fig. 36.** Expresión de eNOS en tejido con actinomicetoma establecido. Imagen representativa al día 45 de tratamiento, sobre el actinomicetoma establecido. a): infección natural, b): tratamiento de Fenofibrato, c): tratamiento de aminoguanidina. Imágenes captadas a 10X.



**Fig. 37.** Inmunoreactividad de LYVE-1 en tejido con actinomicetoma establecido. Evaluación por grupo a diferentes tiempos. Los resultados fueron expresados como el promedio de vasos sanguíneos por campo  $\pm$  SEM.

## Capítulo VII

### Discusión

El tratamiento establecido en la actualidad para el actinomicetoma consiste en la combinación de antibióticos y trimetoprim-sulfametoxazol (bacteriostático). Dichos tratamientos suelen ser costosos y deben administrarse por largos períodos tiempo hasta encontrar que el paciente ha entrado a remisión (28, 102). Considerando que el tratamiento es costoso, la toxicidad inherente de los medicamentos y sus efectos secundarios, es importante encontrar una terapia adyuvante que evite la progresión de la enfermedad, y a su vez que permita la regresión de las lesiones formadas.

Los mecanismos que favorecen el establecimiento de los agentes causales o el desarrollo de la lesión en el sitio de infección no se ha esclarecido por completo. En este trabajo, la angiogénesis fue propuesta como un posible mecanismo por medio del cual la bacteria puede establecerse y desarrollar la enfermedad en el modelo murino de actinomicetoma por *N. brasiliensis* en ratones BALB/c, según los resultados de estudios histológicos previos (3) y en estudios sobre el bloqueo de NO en ratones infectados con esta bacteria (81, 82) anteriormente descritos. Sin embargo, no existen reportes que aseguren que la angiogénesis se desarrolle en el sitio de la lesión del actinomicetoma ni se ha descrito su papel en la patogénesis. Para este trabajo, se considera como una



posible terapia adyuvante la administración de fenofibrato, tras estudiar clínicamente su efecto en ratones con actinomicetoma, infectados con *N. brasiliensis*.

Se ha reportado la administración del fenofibrato en pacientes infectados con VIH bajo terapia antirretroviral altamente activa, con la intención de tratar hiperlipidemias que son resultantes al tratamiento. Las propiedades antiinflamatorias del fenofibrato se han estudiado en pacientes con dislipidemia y aterosclerosis, además de pacientes con enfermedades cardiovasculares e infecciones ocasionadas por *C. pneumoniae*, quienes representan un factor de riesgo para el desarrollo de cardiopatías (94, 103-105).

No se tiene reportado el uso de este medicamento en algún modelo experimental de micetoma ni su administración en pacientes con actinomicetoma por *N. brasiliensis*, siendo este el primer trabajo en el que se reporta el empleo de fenofibrato para el modelo experimental de esta enfermedad.

Se pudo observar que el fenofibrato no actúa sobre la viabilidad de *N. brasiliensis*, comparando los resultados obtenidos con los de amikacina, un antibiótico sobre el cual se había reportado anteriormente la susceptibilidad de la bacteria a este antimicrobiano, con una CMI de 2 µg/ml en el 50% de aislamientos de *N. brasiliensis* reportados por Gómez-Flores *et al.* (29). En este trabajo, el fenofibrato no impide el crecimiento de esta bacteria en dosis cercanas a la necesaria para ejercer su actividad en plasma sanguíneo de ratón ni a dosis mayores. Estos resultados van de acuerdo a lo esperado, sugiriendo que el fenofibrato actúa sobre otros mecanismos sin afectar el crecimiento del microorganismo.

Al final del tratamiento con Fenofibrato, durante el establecimiento de la enfermedad y sobre la enfermedad establecida, se observó una disminución en la aparición de las lesiones características que se aprecian en forma macroscópica y una disminución en las medidas de inflamación comparadas con las medidas del grupo de la infección natural, así como una disminución en el grado de aparición de lesiones histológicas características, esto último entre los días 30 y 45 de tratamiento. Cabe mencionar que no se han reportado trabajos sobre el efecto del fenofibrato en enfermedades establecidas, como en nuestro caso. En general, nuestros resultados son similares a los obtenidos en otras investigaciones de modelos de enfermedades en las que se ha descrito que el proceso de angiogénesis se lleva a cabo. Entre ellos se encuentran modelos de enfermedades inflamatorias de intestino y modelos de retinopatía diabética (106, 107).

Entre estas investigaciones se encuentra aquella en la que la administración de fenofibrato en un modelo de colitis, tras inducir el desarrollo de la enfermedad, resulta en un retraso en la aparición de las características clínicas y lesiones en el tejido, además de una disminución en la producción de citocinas pro-inflamatorias, posiblemente como consecuencia de un retraso en la acumulación de células que las producen o a través de la disminución directa en la expresión de dichas citocinas por regulación génica, sin descartar que ambos mecanismos puedan presentarse en forma simultánea (108).

En nuestro trabajo no se llegó a determinar si existe un cambio en el perfil de citocinas expresadas a lo largo de la patología, en cambio se observó una disminución en la aparición de células pro-inflamatorias en el infiltrado celular de los microabscesos así como en tejido circundante, lo que da lugar a pensar que las citocinas proinflamatorias

podrían ser detectadas en menor concentración, debido a un menor número de células infiltradas en el tejido dañado. Se piensa también que un menor número de células inflamatorias acumuladas influyen en la aparición de un menor grado de lesiones y en la disminución de las medidas de inflamación.

A lo largo del tiempo de evaluación se observó un incremento en el número de vasos sanguíneos en grupos que desarrollaron la historia natural de la infección, confirmando que el proceso de angiogénesis se lleva a cabo durante el desarrollo del actinomicetoma.

Bajo el tratamiento con fenofibrato se observó entre los día 30 y 45 de administración una disminución en el número de vasos sanguíneos durante el establecimiento de la enfermedad y en tejido con micetoma establecido. Estos resultados son similares a los obtenidos por Chen *et al.* (109, 110), quienes administraron Fenofibrato en un modelo murino de retinopatía diabética y observaron una disminución en la formación de vasos sanguíneos a consecuencia de la inhibición en la expresión de VEGF, desencadenada a partir de condiciones de hipoxia en el tejido.

Hasta el momento, en nuestro modelo de trabajo no se conoce si la disminución en la formación de vasos sanguíneos es ocasionada sólo por inhibir la expresión de VEGF o por otros factores pro-angiogénicos. Las células infiltradas en los microabscesos del micetoma (células polimorfonucleares, macrófagos, linfocitos) son capaces de expresar VEGF (111-113), además de citocinas pro-inflamatorias, por lo tanto, es posible que la expresión de VEGF en el tejido disminuya debido a un menor grado de aparición de dichas células inflamatorias, pero no se ha determinado si las

células endoteliales, fibroblastos y células estromales también disminuyen la expresión de esta proteína.

Recordando que el proceso de inflamación contribuye al inicio y mantenimiento del proceso angiogénico (37), se puede deducir que un retraso en la aparición de dichas células pro-inflamatorias puede ser el responsable de un menor número de vasos sanguíneos formados. Según lo publicado por Solís *et al.* (3), de las citocinas que son expresadas en el tejido de actinomicetoma experimental, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8, además de establecer un ambiente que favorece la progresión de la enfermedad, junto con factores de crecimiento y otras quimiocinas, estimulan el proceso de angiogénesis. Estas moléculas son expresadas por células del sistema inmune que conforman el infiltrado celular de los abscesos, además de células estromales, ejerciendo control sobre la proliferación y migración de las células de endotelio vascular (37, 114). Es importante determinar si existen cambios en la expresión de estos factores pro-angiogénicos tras la administración de fenofibrato, y comprobar si este es un mecanismo mediante el cual se inhibe la formación de vasos sanguíneos en este modelo experimental.

Los sitios con mayor vascularización fueron encontrados en los anillos de fibrosis rodeando los microabscesos en el micetoma, lo que nos hace considerar que la angiogénesis puede formar parte del proceso de cicatrización en el tejido infectado (115), tras la constante formación de lesiones a causa de la respuesta inflamatoria intensa. Sin embargo, también se apoya la idea de que el proceso contribuye a la formación de las lesiones del actinomicetoma, tras los resultados anteriormente mencionados en los que de forma indirecta se demuestra una disminución en la

formación de vasos sanguíneos y a su vez una disminución en el grado de inflamación y aparición de lesiones tras la administración de fenofibrato.

El marcaje con VEGF y eNOS nos permite cuantificar vasos sanguíneos por campo, no así con el marcaje de vasos linfáticos con LYVE-1, inicialmente considerado como un marcador indirecto de angiogénesis.

En todas las condiciones de tratamiento que se realizaron, se observa un mayor número de vasos linfáticos al día 7 de tratamiento, y en días posteriores se observó una disminución en las cuentas de estas estructuras. Un comportamiento similar ha sido anteriormente reportado por Paavonen *et al.* (116) en estudios con diferentes modelos de cicatrización de heridas con inflamación crónica, donde observó la aparición de vasos linfáticos de forma simultánea con la formación de vasos sanguíneos. No obstante, el número de vasos linfáticos que se desarrollan es menor al de los vasos sanguíneos, y muestran una regresión rápida, sugiriendo que la linfoangiogénesis ocurre de manera transitoria durante la cicatrización de heridas.

Se cree que la formación de vasos linfáticos es importante en las etapas iniciales de la infección, siendo estas estructuras un medio por el que llegan células del sistema inmune desde diferentes órganos del cuerpo y que contribuyen al proceso de cicatrización, lo que podría explicar la regresión de los vasos formados conforme existe un área mayor de cicatrización.

Por el momento, se descarta a LYVE-1 como un marcador indirecto de los vasos sanguíneos en este modelo experimental, debido a que no existe una correlación entre el

número de vasos sanguíneos que aparecen en la lesión con el número de vasos linfáticos formados.

Estos resultados abren nuevas oportunidades de estudio para el desarrollo de terapias alternativas o adyuvantes para tratar al actinomicetoma, a partir de fármacos autorizados para su administración en humanos para otras condiciones específicas. Es importante desarrollar otros tipos de estudio hasta obtener resultados con mayor beneficio, con la intención de detener el progreso de la enfermedad y dar lugar a la regeneración del tejido dañado en menor tiempo. Se obtiene mayor beneficio al administrar fenofibrato durante el establecimiento del actinomicetoma, comparado con los grupos del actinomicetoma establecido, sin embargo, deben establecerse dosis adecuadas para cada situación.

Es probable que sea necesaria la administración simultánea de algún antibiótico del cual se conozca que *N. brasiliensis* sea susceptible, evitando su replicación en la zona afectada, mientras que el fenofibrato actúa evitando la formación de vasos sanguíneos, siendo posible inhibir la progresión del actinomicetoma.

Los aspectos que deben considerarse además del ajuste de las dosis son los siguientes: el empleo de otros fármacos de la clase de los fibratos, en combinación o en forma individual, la combinación con otras terapias establecidas para tratar el actinomicetoma (antibióticos), y encontrar otros blancos terapéuticos para inhibir el proceso de angiogénesis de forma farmacológica.

## Capítulo VIII

### Conclusiones

1. El número de vasos sanguíneos se incrementa conforme avanza el tiempo de la infección en el modelo experimental de actinomicetoma por *N. brasiliensis*.
2. La angiogénesis contribuye al aumento del tamaño del actinomicetoma experimental.
3. La disminución de la angiogénesis por el tratamiento con fenofibrato conlleva a una disminución del grado de la lesión en el actinomicetoma.

## Capítulo IX

### Referencias

1. **Ameen M, Arenas R.** 2009. Developments in the management of mycetomas. *Clinical and Experimental Dermatology* Volume 34, Issue 1. *Clinical and Experimental Dermatology*. **34**(1):1-7.
2. **Serrano JA, Beaman BL.** 2007. Actinomycetoma: mecanismos de patogenicidad., p 89-91, Actinomycetoma, Primera ed, México, D.F.
3. **Solis-Soto JM, Quintanilla-Rodriguez LE, Meester I, Segoviano-Ramirez JC, Vazquez-Juarez JL, Carmona MCS.** 2008. In situ detection and distribution of inflammatory cytokines during the course of infection with *Nocardia brasiliensis*. *Histology and Histopathology* **23**:573-581.
4. **Welsh O, Vera-Cabrera L, Salinas-Carmona MC.** 2007. Mycetoma. *Clinics in Dermatology* **25**:195-202.
5. **Salinas Carmona MC, Castro Corona MdlÁ, Licón Trillo Á.** 2002. Mecanismos de patogenicidad de *Nocardia brasiliensis* y *Nocardia asteroides*. *Medicina Universitaria* **4**:97-101.
6. **Fahal AH.** 2011. Mycetoma. *Khartoum Medical Journal* **04**:514-523.
7. **van de Sande WWJ.** 2013. Global Burden of Human Mycetoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *Plos Neglected Tropical Diseases* **7**.
8. **Serrano J, Novoa-Montero D.** 2007. Epidemiología del actinomycetoma en las Américas. *In* Serrano J, ÁH S, BL B (ed), Actinomycetoma, Primera ed. Plaza y Valdes Editores., México.
9. **López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Bonifaz A, Arenas R, Mayorga J, Welsh O, Vera-Cabrera L, Padilla-Desgarenes MdC, Contreras Pérez C, Chávez G, Estrada R, Hernández-Hernández F, Manzano-Gayosso P.** 2013. Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3933 casos. *Gaceta Médica de México* **149**:586-592.
10. **Bonifaz A, Tirado-Sanchez A, Calderon L, Saul A, Araiza J, Hernandez M, Gonzalez GM, María Ponce R.** 2014. Mycetoma: Experience of 482 Cases in a Single Center in Mexico. *Plos Neglected Tropical Diseases* **8**.
11. **Fahal AH.** 2010. Managment of mycetoma. *Expert Review of Dermatology* **5**.
12. **Lichon V, Khachemoune A.** 2006. Mycetoma: A review. *American Journal of Clinical Dermatology* **7**:315-321.
13. **Fahal AH.** 2004. Mycetoma: a thorn in the flesh. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **98**:3-11.
14. **van Belkum A, Fahal A, van de Sande WWJ.** 2013. Mycetoma Caused by *Madurella mycetomatis*: A Completely Neglected Medico-social Dilemma. *Hot Topics in Infection and Immunity in Children* **764**:179-189.
15. **Welsh O.** 1991. Mycetoma - current concepts in treatment. *International Journal of Dermatology* **30**:387-398.
16. **Rosas-Taraco AG, Perez-Linan AR, Bocanegra-Ibarias P, Perez-Rivera LI, Salinas-Carmona MC.** 2012. *Nocardia brasiliensis* Induces an Immunosuppressive Microenvironment That Favors Chronic Infection in BALB/c Mice. *Infection and Immunity* **80**:2493-2499.
17. **Trevino-Villarreal JH, Vera-Cabrera L, Valero-Guillen PL, Salinas-Carmona MC.** 2012. *Nocardia brasiliensis* Cell Wall Lipids Modulate Macrophage and Dendritic Responses That Favor Development of Experimental Actinomycetoma in BALB/c Mice. *Infection and Immunity* **80**:3587-3601.
18. **Kanetsuna F, Bartoli A.** 1972. A Simple Chemical Method to Differentiate Mycobacterium from *Nocardia* *Journal of General Microbiology* **70**:209-212.
19. **Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ.** 2006. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* **19**:259-+.
20. **Rodríguez Acar M, Sánchez D, Paulino R, Padilla MdC, Ramos-Garibay A.** 2004. Micetoma podal por *Nocardia brasiliensis*. Reporte de un caso. *Centro Dermatológico Pascua* **13**:37-40.
21. **Lederer E.** 1971. The Mycobacterial Cell Wall. *Pure Appl Chem* **25**:135-165.



22. **Salinas-Carmona MC, Torres-Lopez E, Ramos AI, Licon-Trillo A, Gonzalez-Spencer D.** 1999. Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infection and Immunity* **67**:2428-2432.
23. **Zlotnik H.** 2007. Reproducción experimental de actinomycetoma en animales de laboratorio., p 79-86. *In* Serrano JA, Sandoval áH, Beaman BL (ed), *Actinomycetoma*, Primera ed. Plaza y Valdes Editores, México.
24. **Meester I.** 2012. Estudio de la formación de las células espumosas en el actinomycetoma experimental inducido por *Nocardia brasiliensis*. Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
25. **Sandoval Trujillo H, Sánchez-Saucedo NL, Serrano JA, Goodfellow M.** 2007. Aspectos taxonómicos, bacteriológicos, citoquímicos y de diagnóstico microbiológico de actinomycetos aerobios productores de actinomycetoma, p 37-76. *In* Serrano JA, Sandoval ÁH, Beaman BL (ed), *Actinomycetoma*, Primera ed. Plaza y Valdes Editores, México.
26. **Treviño Villarreal JH.** 2009. El Papel de los Lípidos de Superficie de *Nocardia brasiliensis* en el Establecimiento del Actinomycetoma Experimental Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
27. **Mejía MA, Serrano JA.** 2007. Patología del actinomycetoma, p 141-158. *In* Serrano JA, Sandoval ÁH, Beaman BL (ed), *Actinomycetoma*, Primera ed. Plaza y Valdes Editores, México.
28. **Welsh O, Saucedo E, Gonzalez J, Ocampo J.** 1987. Amikacin alone and in combination with trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of actinomycotic mycetoma. *Journal of the American Academy of Dermatology* **17**:443-448.
29. **Gomez-Flores A, Welsh O, Said-Fernandez S, Lozano-Garza G, Tavarez-Alejandro RE, Vera-Cabrera L.** 2004. In vitro and in vivo activities of antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**:832-837.
30. **Darai E, Bringuier AF, Walker-Combrouze F, Fauconnier A, Couvelard A, Feldmann G, Madelenat P, Scoazec JY.** 1998. CD31 expression in benign, borderline, and malignant epithelial ovarian tumors: An immunohistochemical and serological analysis. *Gynecologic Oncology* **71**:122-127.
31. **Crawford Y, Ferrara N.** 2008. Mouse models to investigate anti-cancer effects of VEGF inhibitors, p 125-139. *In* Cheresh D (ed), *Methods in enzymology*, vol 445. Elsevier Inc.
32. **Halin C, Detmar M.** 2008. Inflammation, angiogenesis and lymphangiogenesis, vol 445. Elsevier, Inc.
33. **Carmeliet P, Jain RK.** 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**:249-257.
34. **Papetti M, Herman IM.** 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **282**:C947-C970.
35. **Bergers G, Benjamin LE.** 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer* **3**:401-410.
36. **Kempf VAJ, Volkman B, Schaller M, Sander CA, Alitalo K, Riess T, Autenrieth IB.** 2001. Evidence of a leading role for VEGF in Bartonella henselae-induced endothelial cell proliferations. *Cellular Microbiology* **3**:623-632.
37. **Granger DN, Senchenkova E.** 2010. Angiogenesis, Inflammation and the microcirculation. Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael, CA.
38. **Grau R, Diaz-Munoz MD, Cacheiro-Llaguno C, Fresno M, Iniguez MA.** 2008. Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha in the Control of Cyclooxygenase 2 and Vascular Endothelial Growth Factor: Involvement in Tumor Growth. *Ppar Research*.
39. **Panigrahy D, Kaipainen A, Huang S, Butterfield CE, Barnes CM, Fannon M, Laforme AM, Chaponis DM, Folkman J, Kieran MW.** 2008. PPAR alpha agonist fenofibrate suppresses tumor growth through direct and indirect angiogenesis inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:985-990.
40. **Dvorak HF.** 2005. Angiogenesis: update 2005. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **3**:1835-1842.
41. **Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA.** 2004. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological Reviews* **56**:549-580.
42. **Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J.** 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* **9**:669-676.

43. **Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH.** 2005. Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **9**:777-794.
44. **Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K.** 2009. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* **21**:154-165.
45. **Ilan N, Mahooti S, Rimm DL, Madri JA.** 1999. PECAM-1 (CD31) functions as a reservoir for and a modulator of tyrosine-phosphorylated beta-catenin. *Journal of Cell Science* **112**:3005-3014.
46. **Motz GT, Coukos G.** 2011. The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales. *Nature Reviews Immunology* **11**:702-711.
47. **Carratelli CR, Paolillo R, Rizzo A.** 2007. Chlamydia pneumoniae stimulates the proliferation of HUVEC through the induction of VEGF by THP-1. *International Immunopharmacology* **7**:287-294.
48. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed.
49. **Bruneau S, Woda CB, Daly KP, Boneschansker L, Kochupurakkal N, Contreras AG, Seto T, Briscoe DM.** 2012. Key features of the intragraft microenvironment that determine long-term survival following transplantation. *Frontiers in Immunology* **3**:1-13.
50. **Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J.** 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**:242-248.
51. **Strickler JH, Hurwitz HI.** 2012. Bevacizumab-Based Therapies in the First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Oncologist* **17**:513-524.
52. **Macaron NC, Cohen C, Chen SC, Arbiser JL.** 2003. Cutaneous lesions of secondary syphilis are highly angiogenic. *Journal of the American Academy of Dermatology* **48**:878-881.
53. **Cerimele F, Brown LF, Bravo F, Ihler GM, Kouadio P, Arbiser JL.** 2003. Infectious angiogenesis: Bartonella bacilliformis infection results in endothelial production of angiopoietin-2 and epidermal production of vascular endothelial growth factor. *American Journal of Pathology* **163**:1321-1327.
54. **Kundu M, Saha P, Pathak SK.** 2005. The secreted peptidylprolyl cis-,trans-isomerase HP0175 of Helicobacter pylori induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in gastric epithelial cells. *Helicobacter* **10**:490-490.
55. **Strowski MZ, Cramer T, Schaefer G, Juettner S, Walduck A, Schipani E, Kemmner W, Wessler S, Wunder C, Weber M, Meyer TF, Wiedenmann B, Joens T, Naumann M, Hoecker M.** 2004. Helicobacter pylori stimulates host vascular endothelial growth factor-A (vegfa) gene expression via MEK/ERK-dependent activation of Sp1 and Sp3. *FASEB Journal* **18**:218-220.
56. **Garcia FU, Wojta J, Broadley KN, Davidson JM, Hoover RL.** 1990. Bartonella-bacilliformis stimulates endothelial-cells invitro and is angiogenic invivo. *American Journal of Pathology* **136**:1125-1135.
57. **Bashir A, Saeed AM, Frede S, Freitag P, van de Sande WWJ, Baba HA, Fahal A, Fandrey J.** 2009. Role of hypoxia-inducible factor-1 in the induction of angiogenesis in mycetoma lesion abstr Mycetoma International Week 2009, Soba University Hospital, Sudan,
58. **Bashir AI, Saeed AM, Frede S, Freitag P, van de Sande WWJ, Baba HA, Fahal AH, Fandrey J.** 2009. Role of fungal products in the induction of angiogenesis mediated by hypoxia-inducible factor-1 in mycetoma lesion. *Journal of Physiological Sciences* **59**:487-487.
59. **Baluk P, McDonald DM.** 2008. Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Lymphatic Continuum Revisited* **1131**:1-12.
60. **Choi WWL, Lewis MM, Lawson D, Yin-Goen QQ, Birdsong GG, Cotsonis GA, Cohen C, Young AN.** 2005. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Modern Pathology* **18**:143-152.
61. **Nakao S, Zandi S, Hata Y, Kawahara S, Arita R, Schering A, Sun D, Melhorn MI, Ito Y, Lara-Castillo N, Ishibashi T, Hafezi-Moghadam A.** 2011. Blood vessel endothelial VEGFR-2 delays lymphangiogenesis: an endogenous trapping mechanism links lymph- and angiogenesis. *Blood* **117**:1081-1090.

62. **Alitalo K, Carmeliet P.** 2002. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* **1**:219-227.
63. **Jackson DG.** 2003. The lymphatics revisited - New perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. *Trends in Cardiovascular Medicine* **13**:1-7.
64. **Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Gatter KC, Harris AL, Jackson DG.** 2005. LYVE-1 immunohistochemical assessment of lymphangiogenesis in endometrial and lung cancer. *Journal of Clinical Pathology* **58**:202-206.
65. **Lee JY, Spicer AP.** 2000. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Current Opinion in Cell Biology* **12**:581-586.
66. **Enholm B, Karpanen T, Jeltsch M, Kubo H, Stenback F, Prevo R, Jackson DG, Yla-Herttuala S, Alitalo K.** 2001. Adenoviral expression of vascular endothelial growth factor-C induces lymphangiogenesis in the skin. *Circulation Research* **88**:623-629.
67. **Kubes P, Suzuki M, Granger DN.** 1991. Nitric-oxide - an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**:4651-4655.
68. **Bogdan C.** 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* **2**:907-916.
69. **Fukumura D, Jain RK.** 1998. Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors. *Cancer and Metastasis Reviews* **17**:77-89.
70. **Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F.** 1994. NITRIC-OXIDE MEDIATES ANGIOGENESIS IN-VIVO AND ENDOTHELIAL-CELL GROWTH AND MIGRATION IN-VITRO PROMOTED BY SUBSTANCE-P. *Journal of Clinical Investigation* **94**:2036-2044.
71. **Lee PC, Salyapongse AN, Bragdon GA, Shears LL, Watkins SC, Edington HDJ, Billiar TR.** 1999. Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **277**:H1600-H1608.
72. **MacLauchlan S, Yu J, Parrish M, Asoulin TA, Schleicher M, Krady MM, Zeng J, Huang PL, Sessa WC, Kyriakides TR.** 2011. Endothelial nitric oxide synthase controls the expression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:E1137-E1145.
73. **Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC.** 1998. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *Journal of Clinical Investigation* **101**:731-736.
74. **Isenberg JS, Ridnour LA, Perruccio EM, Espey MG, Wink DA, Roberts DD.** 2005. Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cGMP-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:13141-13146.
75. **Jones MK, Tsugawa K, Tarnawski AS, Baatar D.** 2004. Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: possible roles of PKC, ERK, and AP-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **318**:520-528.
76. **Carreau A, Kieda C, Grillon C.** 2011. Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment. *Experimental Cell Research* **317**:29-41.
77. **Coulet F, Nadaud S, Agrapart M, Soubrier F.** 2003. Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. *Journal of Biological Chemistry* **278**:46230-46240.
78. **Facemire CS, Nixon AB, Griffiths R, Hurwitz H, Coffman TM.** 2009. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Controls Blood Pressure by Regulating Nitric Oxide Synthase Expression. *Hypertension* **54**:652-658.
79. **Cooke JP, Losordo DW.** 2002. Nitric oxide and angiogenesis. *Circulation* **105**:2133-2135.
80. **Morbidelli L, Donnini S, Ziche M.** 2008. Nitric Oxide in Tumor Angiogenesis p193-204. *In* Figg W, Folkman J (ed), *Angiogenesis: An Integrative Approach from Science to Medicine*. Springer.
81. **Salinas Carmona MC, Vázquez Marmolejo AV, López Ulloa JA, Garza Esquivel H, Salinas Peña R.** 2011. Efectos del bloqueo de inos por aminoguanidina en el actinomicetoma por

- nocardia brasiliensis, abstr XXVI Congreso Nacional de Investigación en Medicina, Cintermex, Monterrey, N.L., México,
82. **Vazquez-Marmolejo AV, Salinas-Carmona MC, Perez-Rivera LI, Atilano-Diaz A, Dominguez-Armendariz DE.** 2013. Study of the development of actinomycetoma during *Nocardia brasiliensis* infection in mice with partial genetic blockade of eNOS, abstr 15th International Congress of Immunology, MiCo - Milano Congressi, Milan, Italy,
  83. **Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JG.** 1998. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* **98**:2088-2093.
  84. **Cámara-Lemarroy CR, Rodríguez-Gutiérrez R, Villarreal-Alarcón MA.** 2013. Could fibrates (PPAR-alpha ligands) have a therapeutic potential in glioblastoma multiforme?. *Medicina Universitaria, Elsevier* **15**:95-98.
  85. **Bishop-Bailey D.** 2011. PPARs and angiogenesis. *Biochemical Society Transactions* **39**:1601-1605.
  86. **Michalik L, Desvergne B, Wahli W.** 2004. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: Complex stories. *Nature Reviews Cancer* **4**:61-70.
  87. **Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CNA, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM, Staels B, Wahli W.** 2006. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacological Reviews* **58**:726-741.
  88. **Fruchart JC, Duriez P, Staels B.** 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* **10**:245-257.
  89. **Rival Y, Beneteau N, Taillandier T, Pezet M, Dupont-Passelaigue E, Patoiseau JF, Junquero D, Colpaert FC, Delhon A.** 2002. PPAR alpha and PPAR delta activators inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappa B and expression of VCAM-1 in EAhy926 endothelial cells. *European Journal of Pharmacology* **435**:143-151.
  90. **Deliverie P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghen W, Peters J, Gonzalez F, Fruchart J-C, Tedgui A, Haegeman G, Staels B.** 1999. Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha Negatively Regulates Vascular Inflammatory Gene Response by Negative Cross-talk Transcription Factors NF-kB and AP-1. *Journal of Biological Chemistry* **274**:32048-32054.
  91. **Wiel E, Lebuffe G, Robin E, Gasan G, Corseaux D, Tavernier B, Jude B, Bordet R, Vallet B.** 2005. Pretreatment with peroxysome proliferator-activated receptor alpha agonist fenofibrate protects endothelium in rabbit *Escherichia coli* endotoxin-induced shock. *Intensive Care Medicine* **31**:1269-1279.
  92. **Meissner M, Stein M, Urbich C, Reisinger K, Suske G, Staels B, Kaufmann R, Gille J.** 2003. PPARalpha Activators Inhibit Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Expression by Repressing Sp1-Dependent DNA Binding and Transactivation. *Journal of the American Heart Association* **94**:324-332.
  93. **Law V, Knox C, Djoumbou Y, Jewison T, Guo AC, Liu Y, Maciejewski A, Arndt D, Wilson M, Tang A, Gabriel G, Ly C, Adamjee S, Dame ZT, Han B, Zhou Y, Wishart DS.** 2013. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Res* **42**:D1091-D1097.
  94. **Márk L, Márki-Zay J, Orosz I, Kondacs A, Erdei F, Katona A.** 2003. Pleiotropic effect of the micronized fenofibrate: the reduction of plasma of *Chlamydia pneumoniae* antibody levels with coronary artery disease. *Orvosi Hetilap* **144**:765-768.
  95. **Varet J, Vincent L, Mirshahi P, Pille JV, Legrand E, Opolon P, Mishal Z, Soria J, Li H, Soria C.** 2003. Fenofibrate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**:810-819.
  96. **Li T, Zhang Q, Zhang J, Yang G, Shao Z, Luo J, Fan M, Ni C, Wu Z, Hu X.** 2014. Fenofibrate induces apoptosis of triple-negative breast cancer cells via activation of NF-kappa B pathway. *Bmc Cancer* **14**.
  97. **Huang J, Das SK, Jha P, Al Zoughbi W, Schauer S, Claudel T, Sexl V, Vesely P, Birner-Gruenberger R, Kratky D, Trauner M, Hoefler G.** 2013. The PPAR alpha agonist fenofibrate suppresses B-cell lymphoma in mice by modulating lipid metabolism. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1831**:1555-1565.

98. **Wilk A, Urbanska K, Grabacka M, Mullinax J, Marcinkiewicz C, Impastato D, Estrada JJ, Reiss K.** 2012. Fenofibrate-induced nuclear translocation of FoxO3A triggers Bim-mediated apoptosis in glioblastoma cells in vitro. *Cell Cycle* **11**:2660-2671.
99. **Zak Z, Gelebart P, Lai R.** 2010. Fenofibrate induces effective apoptosis in mantle cell lymphoma by inhibiting the TNF alpha/NF-kappa B signaling axis. *Leukemia* **24**:1476-1486.
100. **Chang NW, Tsai M-H, Lin C, Hsu HT, Chu P-Y, Yeh C-M, Chiu C-F, Yeh K-T.** 2011. Fenofibrate exhibits a high potential to suppress the formation of squamous cell carcinoma in an oral-specific 4-nitroquinoline 1-oxide/arecoline mouse model. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **1812**:558-564.
101. **Kubota T, Yano T, Fujisaki K, Itoh Y, Oishi R.** 2005. Fenofibrate induces apoptotic injury in cultured human hepatocytes by inhibiting phosphorylation of Akt. *Apoptosis* **10**:349-358.
102. **Sharma NL, Mahajan VK, Agarwal S, Katoch VM, Das R, Kashyap M, Gupta P, Verma GK.** 2008. Nocardial mycetoma: Diverse clinical presentations. *Indian Journal of Dermatology Venereology & Leprology* **74**:635-640.
103. **Calza L, Manfredi R, Chiodo F.** 2003. Statins and fibrates for the treatment of hyperlipidaemia in HIV-infected patients receiving HAART. *Aids* **17**:851-859.
104. **Mei C-l, He P, Cheng B, Liu W, Wang Y-f, Wan J-j.** 2009. Chlamydia pneumoniae induces macrophage-derived foam cell formation via PPAR alpha and PPAR gamma-dependent pathways. *Cell Biology International* **33**:301-308.
105. **Tsimihodimos V, Miltiadous G, Daskalopoulou SS, Mikhailidis DP, Elisaf MS.** 2005. Fenofibrate: Metabolic and pleiotropic effects. *Current Vascular Pharmacology* **3**:87-98.
106. **Schirbel A, Kessler S, Rieder F, West G, Rebert N, Asosingh K, McDonald C, Fiocchi C.** 2013. Pro-Angiogenic Activity of TLRs and NLRs: A Novel Link Between Gut Microbiota and Intestinal Angiogenesis. *Gastroenterology* **144**:613-+.
107. **Willard AL, Herman IM.** 2012. Vascular Complications and Diabetes: Current Therapies and Future Challenges. *Journal of Ophthalmology*.
108. **Lee JW, Bajwa PJ, Carson MJ, Jeske DR, Cong Y, Elson CO, Lytle C, Straus DS.** 2007. Fenofibrate represses interleukin-17 and interferon-gamma expression and improves colitis in interleukin-10-deficient mice. *Gastroenterology* **133**:108-123.
109. **Chen Y, Hu Y, Lin M, Jenkins AJ, Keech AC, Mott R, Lyons TJ, Ma J-x.** 2013. Therapeutic Effects of PPAR alpha Agonists on Diabetic Retinopathy in Type 1 Diabetes Models. *Diabetes* **62**:261-272.
110. **Abcouwer SF.** 2013. Direct Effects of PPAR alpha Agonists on Retinal Inflammation and Angiogenesis May Explain How Fenofibrate Lowers Risk of Severe Proliferative Diabetic Retinopathy. *Diabetes* **62**:36-38.
111. **Gaudry M, Brgerie O, Andrieu V, ElBenna J, Pocidallo MA, Hakim J.** 1997. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood* **90**:4153-4161.
112. **Kiriakidis S, Andreakos E, Monaco C, Foxwell B, Feldmann M, Paleolog E.** 2002. VEGF expression in human macrophages is NF kappa B-dependent: studies using adenoviruses expressing a kinase defective form of IKK2 or I kappa B alpha the natural NF kappa B inhibitor. *Rheumatology* **41**:66-66.
113. **Freeman MR, Schneck FX, Gagnon ML, Corless C, Soker S, Niknejad K, Peoples GE, Klagsbrun M.** 1995. Peripheral-blood t-lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth-factor - a potential role for T-cells in angiogenesis. *Cancer Research* **55**:4140-4145.
114. **Arroyo AG, Iruela-Arispe ML.** 2010. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovascular Research* **86**:226-235.
115. **Eming SA, Brachvogel B, Odorasio T, Koch M.** 2007. Regulation of angiogenesis: Wound healing as a model. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* **42**:115-170.
116. **Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L, Jahkola T, Alitalo K.** 2000. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *American Journal of Pathology* **156**:1499-1504.

## Anexos

### I. Preparación de reactivos

#### I.1 Buffer PBS (buffer fosfato salino), 1X

Disolver 8 g de NaCl, 0.2g de KCl, 1.44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH de la solución a 7.2-7.4. Aforar a 1L con agua destilada. Conservar la solución a temperatura ambiente.

#### I.2 Buffer Tris-HCl, 1 X

Para 1L de solución, añadir 6.1 g de Tris-HCl en 700 ml de agua destilada. Ajustar a pH 7.2-7.4 y aforar a 1L. Conservar a temperatura ambiente.

#### I.3 Formaldehído al 3.7% en PBS 1X

Para 1L de solución, añadir 100 ml de formaldehído al 37% en 900 ml de PBS 1x.

#### I.4 Buffer de citratos, 10mM ácido cítrico, 0.05% Tween 20, pH 6.0

Pesar 1.92g de NaH<sub>2</sub>(C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O(COO))<sub>3</sub>, disolver en 800ml de agua destilada. Ajustar pH a 6. Aforar a 1000 ml con agua destilada. Agregar 500µl Tween 20. La solución se conserva a 4°C, y tiene caducidad de 3 meses.

#### I.5 Solución de lavado. Para preparar 100ml

Medir 99.5 ml de PBS o TBS pH 7.2-7.4. Añadir 500µl Tween 20.

#### I.6 Peróxido de hidrogeno al 3%.

En 90ml de PBS o TBS pH 7.2-7.4 añadir 10ml de peróxido de hidrógeno al 30%. La solución se conserva a 4°C y tiene caducidad de 3 meses.

#### I.7 Solución de bloqueo

En 98.1 ml de PBS o TBS pH 7.2 – 7.4 o TBS pH 8.4, añadir 1 ml de suero, 1 g de Albumina Sérica Bovina, y 0.1 ml de la solución stock de gelatina de pescado 10%.

#### I.8 Stock 10% gelatina de pescado

10g de gelatina de pescado en 100ml de PBS o TBS pH 7.2-7.4 o TBS pH 8.4.

#### I.9 Solución diluyente.

0.01g Albumina Sérica Bovina en 10ml PBS o TBS pH 7.2-7.4 o TBS pH 8.4.

#### I.10 Segundo Ac, kit VECTASTAIN ABC KIT

- **Solución 1:** 5µl del anticuerpo del vial azul en 1 ml PBS o TBS pH 7.2-7.4
- **Solución 2:** a un ml de PBS o TBS pH 7.2-7.4, añadir 10 µl del vial, seguido de 10 µl del vial B.

### **I.11 Solución de sustrato/cromógeno, kit ImmPACT DAB**

Agregar una gota del cromógeno (gotero) en un ml de diluyente.

### **I.12 Solución de Formaldehído al 10%**

- 9,73 ml de PBS 1X
- 0,27 ml de Formaldehído al 37%

### **I.13 Solución de hematoxilina de Gill.**

Para 1L de solución, a 730 ml de agua destilada, añadir los siguientes reactivos:

- 250 ml de etilenglicol
- 2 g de hematoxilina anhidra
- 0.2 g de yodato de sodio
- 17.6 g de sulfato de aluminio
- 2 ml de ácido acético glacial

### **I.14 Solución de Eosina.**

Para 100 ml de solución:

- 1 g de Eosina amarillenta
- 20 ml de agua destilada
- 80 ml de alcohol al 96%

## Resumen autobiográfico

Flora Eduarda Cruz López

Candidato para el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en  
Inmunología Médica

Tesis: “EL PAPEL DE LA ANGIOGÉNESIS EN LA PATOGENIA DEL  
ACTINOMICETOMA POR *Nocardia brasiliensis*.”

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Nacida el 5 de julio de 1991 en Guadalupe, Nuevo León. Hija de José Clemente Cruz  
Guel y María Guadalupe López Ochoa.

Educación:

Cursó la licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo en la Facultad de Ciencias  
Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, de 2008 a 2013.

Durante sus estudios de Maestría en Ciencias obtuvo mención como alumno destacado  
en el programa de Inmunología en el año 2014 de la Facultad de Medicina.