



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

EXPLORACIÓN DEL EFECTO DE LA
LEPTINA EN EL DESARROLLO DE LA
OSTEOMIELITIS ESTAFILOCÓCICA EN LA
TIBIA DE LA RATA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Cecilia Hernández Flores

DIRECTORA DE TESIS: Dra. en C.Q. Rebecca Elizabeth Franco y Bourland

MÉXICO, D.F.

Marzo 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de septiembre de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **HERNÁNDEZ FLORES CECILIA**, con número de cuenta 506021374 con la tesis titulada **"EXPLORACIÓN DEL EFECTO DE LA LEPTINA EN EL DESARROLLO DE LA OSTEOMIELITIS ESTAFILOCÓCICA EN LA TIBIA DE LA RATA"**, realizada bajo la dirección del **DRA. REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND**:

Presidente: DR. GONZALO CASTILLO ROJAS
Vocal: DR. GABRIEL GUIZAR SAHAGÚN
Secretario: DRA. REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND
Suplente: DRA. MARGARITA DE LA LUZ CAMORLINGA PONCE
Suplente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de enero de 2009.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México
- ❖ A los miembros de comité tutorial por su apoyo y orientación durante el desarrollo de este trabajo:

Dra. Rebecca E. Franco y Bourlan

Instituto Nacional de Rehabilitación, Servicio de Bioquímica, Secretaría de Salud.

Dr. Gabriel Guízar Sahagún

Proyecto CAMINA, AC.

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

- ♦ A mi asesora la Dra. Rebecca Franco por compartir su conocimiento, charlas, apoyo moral y académico para la realización de este trabajo.
- ♦ A la M.V.Z. Claudia Rivera Cerecedo. Jefa del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Por la donación de todas las ratas para la realización de este trabajo.
- ♦ Al Dr. Dr. René Martín Téllez Gastelum. Jefe del Laboratorio de Patología Clínica (Laboratorio Central) del INR y en especial a la Técnico Laboratorista Clínico Elvira Aida Ortega Rodríguez.
- ♦ A la Dra. Elisa Martínez Coria. Jefa del Servicio de Tomografía Computarizada del INR y al Técnico Radiólogo Martín Luna Méndez por el apoyo brindado.
- ♦ Al personal del Servicio de Radiodiagnóstico del INR por su disposición y apoyo.
- ♦ Al departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.
- ♦ Al Médico Marco Antonio Guerrero Godínez por las horas de trabajo compartido.
- ♦ A mis compañeros del INR en especial a M. en C. Carlos J. Martínez Canseco por su apoyo y asesoría para la realización de este trabajo.
- ♦ A Dr. en C. Víctor Manuel Domínguez Hernández Jefe del Servicio de Biomecánica y al M. en C. Víctor Manuel Araujo Monsalvo por su amistad y el apoyo para la impresión de esta tesis.
- ♦ A todas las ratas Wistar que participaron en este trabajo.

DEDICATORIAS

- ❖ En memoria de Mercedes Azcona (mi abue).
- ❖ A mi familia por todo su apoyo y cariño, en especial a: Conchita, Magda, Silvia, Fabián, Carlos, Daniel, Andrés, Diego, Alberto y Víctor Antonio.
- ❖ A Alfonso por sus consejos, amistad, apoyo y tiempo compartido.

Todos somos muy ignorantes. Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas
Albert Einstein

Lo más bonito que podemos experimentar es el misterio. Es la fuente de toda arte verdadera y de toda ciencia. Aquél a quien sea extraña esta emoción, aquel que no pueda detenerse a maravillarse y permanecer absorto de asombro, es tan bueno como un muerto: sus ojos están cerrados

Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo

Uno debería guardarse contra aquellos que sermonean habitualmente a los jóvenes con la importancia del éxito como principal propósito en la vida. El estímulo más importante para el trabajo, en la escuela y en la vida, es el placer de trabajar, el placer de sus resultados, y el conocimiento del valor del resultado para la comunidad

La única fuente del conocimiento es la experiencia

Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber

No podemos responsabilizar a la gravedad de que la gente caiga en brazos del amor

Albert Einstein

ÍNDICE

RESUMEN.....	iv
SUMMARY.....	v
Abreviaturas.....	vi
I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Osteomielitis.....	1
1.1.1 Generalidades.....	1
1.1.2 Clasificación de las osteomielitis.....	2
1.1.3 Epidemiología.....	2
1.1.4 Respuesta a la infección ósea.....	3
1.1.5 Etiología.....	3
1.1.6 Diagnóstico.....	3
1.1.7 Tratamiento.....	4
1.1.8 Modelos animales de osteomielitis.....	6
1.2 Leptina.....	7
1.2.1 Generalidades.....	7
1.2.2 Balance energético y alimentación.....	7
1.2.3 Sistema inmune e inflamación.....	7
1.2.4 Acción sobre el hueso.....	8
1.3 Osteomielitis y leptina.....	8
II JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	9
III HIPÓTESIS.....	10
IV OBJETIVO GENERAL.....	10
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	10
V MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
5.1 Diseño del estudio.....	11
5.1.1 Animales.....	11
5.1.2 Mantenimiento de ratas a su ingreso al bioterio.....	11
5.1.3 Cepa.....	11
5.1.4 Experimento I: Osteomielitis en tibias de ratas: inoculación con concentraciones decrecientes de inóculo de <i>S. aureus</i> 76 IQM.....	11
5.1.5 Experimento II: Valoración de la leptina administrada a ratas inoculadas en tibia con <i>S. aureus</i> 76 IQM.....	11

5.2 Control de fuentes de error.....	12
5.3 Modelo de osteomielitis en tibia de rata (experimento I).....	12
5.3.1 Infección de las tibias.....	12
5.3.1.1 Recuperación, purificación y caracterización bioquímica de la cepa de trabajo.....	12
5.3.1.2 Almacenamiento de la cepa recuperada.....	16
5.3.1.3 Cuenta de unidades formadoras de colonias (cuenta viable).....	17
5.3.1.4 Procedimiento de inoculación de las tibias.....	18
5.3.1.4.1 Inóculos bacterianos.....	18
5.3.1.4.2 Animales y anestesia.....	18
5.3.1.4.3 Inoculación de bacteria en tibia.....	18
5.3.1.4.4 Mantenimiento de las ratas infectadas.....	21
5.3.2 Aproximación clínica a la infección.....	21
5.3.3 Estudio radiográfico.....	21
5.3.3.1 Parámetros de infección ósea.....	21
5.3.3.2 Elaboración de una escala radiográfica semicuantitativa.....	21
5.3.4 Estudio microbiológico de diversos tejidos de las ratas infectadas.....	21
5.3.4.1 Toma de muestras y sacrificio.....	21
5.3.4.2 Cultivo de las muestras de tejidos de animales infectados en diferentes medios.....	22
5.3.4.3 Confirmación de la identidad de la cepa inoculada por técnicas bioquímicas.....	22
5.4 Tratamiento con leptina (experimento II).....	22
5.4.1 Aplicación de leptina.....	22
5.4.1.1 Animales.....	22
5.4.1.2 Administración de leptina.....	22
5.4.1.2.1 Seguimiento clínico, análisis macroscópico, estudio radiográfico, análisis microbiológico y confirmación de la identidad	22
5.4.1.2.2 Análisis tomográfico.....	22
5.4.1.2.3 Estudios histológicos.....	22
VI RESULTADOS.....	25
6.1 Osteomielitis en tibia de rata: inoculación con concentraciones decrecientes de <i>S. aureus</i> 76 IQM (experimento I).....	25
6.1.1 Inoculación de la bacteria en el canal medular.....	25
6.1.1.1 Verificación de la colocación del clavo dentro del canal medular.....	25
6.1.1.2 Verificación del procedimiento de inoculación en el canal medular con sulfato de bario (Ba ₂ SO ₄).....	25
6.1.1.3 Inoculación de la cepa 76 IQM de <i>S. aureus</i>	25
6.1.2 Seguimiento clínico.....	26

6.1.3 Análisis macroscópico.....	28
6.1.4 Estudio radiográfico.....	29
6.1.4.1 Parámetros de infección ósea.....	30
6.1.4.2 Elaboración de una escala radiográfica semicuantitativa para evaluar la intensidad de la infección ósea.....	31
6.1.4.2.1 Escala radiográfica semicuantitativa.....	31
6.1.5 Estudio microbiológico de diversos tejidos de las ratas infectadas.....	33
6.1.5.1 Confirmación de la identidad de la cepa inoculada por técnicas bioquímicas.....	34
6.2. Conclusiones experimento I.....	34
6.3 Tratamiento con leptina de tibias de rata infectadas con <i>S. aureus</i> 76 IQM (experimento II).....	35
6.3.1 Inoculación bacteriana.....	35
6.3.2 Seguimiento clínico.....	35
6.3.2.1 Ratas infectadas no tratadas.....	38
6.3.2.2 Ratas infectadas tratadas con leptina.....	40
6.3.3 Análisis macroscópico.....	41
6.3.4 Estudio radiográfico.....	44
6.3.4.1 Valoración de la intensidad de la infección ósea.....	44
6.3.5 Análisis tomográfico.....	47
6.3.6 Estudio histológico.....	52
6.3.6.1 Micrografías de cortes histológicos de tibias de ratas infectadas no tratadas.....	52
6.3.6.2 Micrografías de cortes histológicos de tibias de ratas tratadas con leptina.....	53
6.3.6.3 Micrografías de alteraciones óseas específicas de osteomielitis.....	54
6.3.7 Estudio microbiológico de diversos tejidos recuperados de las ratas infectadas y confirmación de la identidad de la cepa inoculada por técnicas bioquímicas.....	58
6.4 Conclusiones experimento II.....	58
VII DISCUSIÓN.....	60
7.1 Modelo de osteomielitis estafilocócica en la tibia de la rata.....	60
7.1.1 Escala radiográfica semicuantitativa.....	60
7.2 Mecanismos de acción de la leptina sobre la osteomielitis.....	60
7.2.1 Respuesta inmune.....	61
7.2.2 Efecto Bactericida.....	61
7.2.3 Acción directa sobre el hueso.....	61
VIII CONCLUSIONES.....	62
IX PERSPECTIVAS.....	62
X BIBLIOGRAFÍA.....	63

RESUMEN

Investigamos el efecto de la administración local de leptina en el desarrollo de la osteomielitis en tibia de rata macho Wistar inoculada con *S. aureus* 76 IQM, aislada de un paciente con osteítis. Para conocer la extensión de las lesiones osteomielíticas tibiales, se inocularon ratas (n=2) con concentraciones decrecientes de bacteria: [39, 4, 2 y 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC)] fueron administradas en 20 μ L de agar al 0.4% en el canal medular tibial izquierdo. Las ratas control (n=5) recibieron 20 μ L del vehículo. A partir de radiografías de tibias osteomielíticas determinamos los parámetros de infección a lo largo de toda la tibia: engrosamiento, deformidad ósea, osteólisis, reacción endóstica, osteoesclerosis, adelgazamiento de las corticales, secuestros y abscesos. Calificando el daño de cada uno de los parámetros observados en las radiografías, se desarrolló una escala radiográfica semicuantitativa para estimar la intensidad de la infección tibial.

Se inocularon 10 ratas con 1×10^6 UFC de *S. aureus*. Cinco de ellas recibieron localmente en el sitio de inoculación leptina recombinante de rata disuelta en agua inyectable (8 μ g/día/30 días); las otras 5 recibieron solo el vehículo. Se siguió el proceso infeccioso diariamente por medio de evaluaciones clínicas (marcha, abscesos en piel, estado de salud general) y quincenalmente por radiografía. Al término de un mes, los animales fueron sacrificados y se estudiaron las tibias disecadas por radiografía, tomografía, histología y evaluaciones macroscópicas y microbiológicas. La intensidad de las manifestaciones clínicas, así como el puntaje en la escala radiográfica semicuantitativa de los parámetros de la infección tibial de las ratas tratadas con leptina fueron significativamente menores que la de las ratas infectadas sin tratar.

La administración local de leptina en el sitio de inoculación disminuyó la intensidad de la infección tibial de ratas inoculadas con *S. aureus*.

SUMMARY

We studied the effect of local administration of leptin in the development of osteomyelitis in the tibia of male Wistar rats inoculated with *S. aureus* 76 IQM, isolated from a patient with osteitis. To determine the extent of tibial osteomyelitic lesions, rats were inoculated with decreasing concentrations of bacteria: [39, 4, 2 and 1×10^6 colony forming units (CFU)] were inoculated in 20 μ L of 0.4% agar in the left tibial medullary cavity. Control rats (n=5) received 20 μ L of the vehicle. Using radiographs of the osteomyelitic tibias we determined the parameters of infection along the entire length of the tibia: thickening, bone deformity, osteolysis, endostic reaction, osteosclerosis, cortical thinning, sequestrae, and abscesses. By rating the damage of each of these parameters from radiographs a semiquantitative radiographic scale was made to rate the intensity of tibial infection.

Ten rats were inoculated with 1×10^6 CFU of *S. aureus*. Five of them received locally, at the inoculation site, rat recombinant leptin dissolved in injectable water (8 μ g/day/30 days), and the remaining 5 rats received only the vehicle. The infection process was followed daily by clinical evaluations (motor activity, skin abscesses, and general state of health), and fortnightly by radiography. At the end of one month, animals were killed and the dissected tibias were studied by radiography, tomography, histology, and macroscopic and microbiologic evaluations. The intensity of clinical manifestations, as well as the scores from the semiquantitative radiographic scale of the parameters of tibial infections of rats treated with leptin were significantly less than their counterparts in the infected rats without treatment.

Local administration of leptin at the site of inoculation reduced the intensity of tibial infection of rats inoculated with *S. aureus*.

ABREVIATURAS

Absorbencia	Abs
Agar- sangre con eritrocitos de carnero	agar-sangre
Agar-agar bacteriológico	agar-agar
Agar-peptona de caseína de harina de soya	agar-CASOY
Caldo-peptona de caseína de harina de soya	caldo-CASOY
Centímetro	cm
Centímetro cúbico	cm ³
Día	d
Factor de necrosis tumoral alfa	FNT- α
Factor estimulante de colonias de granulocitos	G-CSF
Grado centígrado	°C
Gramo	g
Hematoxilina/eosina	HE
Hora	h
Infectadas no tratadas	INT
Infectadas tratadas	IT
Instituto Nacional de Rehabilitación	INR
Interleucina-1	IL-1
Interleucina-6	IL-6
Interleucina-12	IL-12
Kilodalton	kDa
Kilogramo	kg
Kilovolt	kV
Litro	L
Metro	m
Microgramo	μ g
Microlitro	μ L
Miliamper	mA
Miligramo	mg
Mililitro	mL
Milímetro	mm
Nanómetro	nm

Osteoprogerina	OPG
Peso corporal	pc
Polimorfonucleares	PMN
Receptor activador del factor nuclear kappa-β	RANK
Ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-β	RANKL
Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica	RHOVE
Segundo	seg
Solución salina amortiguada con fosfatos pH 7.2 estéril	PBS
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
Tibias Infeccionadas con 1X10 ⁶ UFC	INF-CONTROL
Tibias infectadas con 1X10 ⁶ UFC + leptina (8μg/día/30días)	INF-LEPTINA
Tecnecio-99	Tc-99
Unidades formadoras de colonia	UFC

I INTRODUCCIÓN

1.1 Osteomielitis

1.1.1 Generalidades.

La osteomielitis crónica se trata de una infección ósea difícil de manejar con un impacto importante sobre la calidad de vida de los individuos afectados ya que tiene repercusiones de tipo físico, social, familiar, laboral y económico. Se caracteriza por la destrucción inflamatoria progresiva del hueso, producida por un microorganismo. La infección puede limitarse a una única porción del hueso o puede involucrar varias regiones, como médula, corteza, periostio y tejido blando circundante (Lew y Waldvogel, 2004). La osteomielitis aguda evoluciona a lo largo de varios días o semanas (sub aguda). Un tratamiento tardío o inadecuado puede ocasionar el desarrollo de una infección crónica, la que puede persistir por años, acompañándose de pérdida de la estructura normal del hueso y en consecuencia de la función. Se caracteriza por la persistencia de microorganismos, bajo grado de inflamación, reacción perióstica y formación de involucro, presencia de hueso muerto (secuestro), extensiones fistulosas (Figura 1), recaídas en la misma zona y puede o no ser acompañada de fiebre.

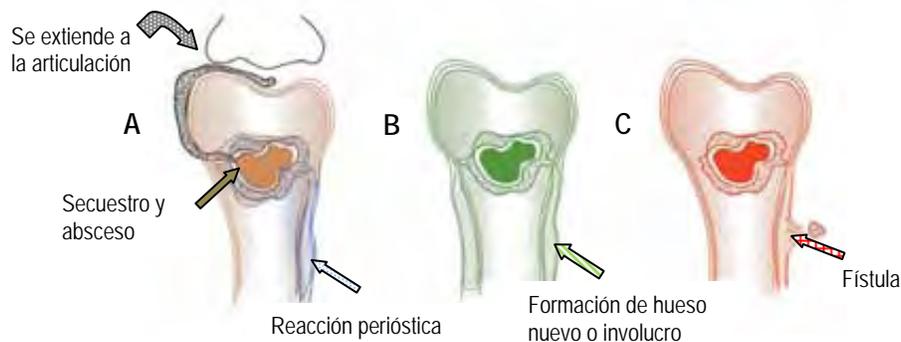


Figura 1. Características de la osteomielitis crónica. Se muestran algunas de las características de la infección ósea causada por *Staphylococcus aureus*. A, presencia de secuestró, absceso y reacción perióstica. La infección se puede extender a la articulación; B, hueso nuevo esponjoso o involucro y C, reacción perióstica y formación de fístula.

Se han identificado diferentes factores que favorecen el desarrollo de osteomielitis. Entre los más importantes se encuentra la presencia de cuerpos extraños a nivel del sistema esquelético, como prótesis ortopédicas o material de fijación de fracturas. Los traumatismos son condiciones que predisponen a la infección ya que favorecen el ingreso de microorganismos al tejido óseo. Las fracturas son el punto de origen más común del proceso infeccioso. Durante la bacteriemia las bacterias que se encuentran en la sangre, pueden localizarse en sitios de baja vascularidad donde el ambiente es adecuado para el desarrollo de una infección, a los que no es fácil que llegue el sistema de defensa

del organismo. Cuando las bacterias proliferan en el hueso se acumulan productos bacterianos, los cuales estimulan una respuesta inflamatoria aguda y un flujo de leucocitos polimorfonucleares (PMN). Este flujo de PMN y de otros factores acumulados favorecen una trombosis vascular y necrosis ósea (Calhoun et al., 2005; Kaplan et al., 2005; Pineda et al., 2006 y Lew et al., 2004).

1.1.2 Clasificación de las osteomielitis.

La clasificación de las osteomielitis se puede hacer según un gran número de criterios (etiología, patogenia, localización, evolución, etc.). La más utilizada es la clasificación patogénica de Lew y Waldvogel (Lew y Waldvogel, 1999), que considera tres clases de osteomielitis: a) secundaria a un foco contiguo de infección; b) asociada a insuficiencia vascular y c) hematógena.

La osteomielitis secundaria a un foco contiguo de infección, es la forma más frecuente de osteomielitis. Habitualmente se asocia con fracturas expuestas y a cirugías reconstructivas de hueso. También se pueden observar infecciones relacionadas a la presencia de prótesis. El fémur y la tibia son los huesos más comúnmente afectados. Los microorganismos se introducen al tejido óseo posterior a una lesión traumática, durante la reducción quirúrgica del hueso fracturado o al momento de la fijación interna de la fractura. Infecciones en la pelvis, manos (por heridas secundarias a mordeduras), senos paranasales y área periodontal pueden ser el foco primario de infección.

La osteomielitis asociada a insuficiencia vascular, se presenta principalmente en los pacientes con insuficiencia vascular, arterial o en pacientes diabéticos de larga evolución con neuropatía periférica. En la mayoría de los casos la infección se presenta exclusivamente a nivel de extremidades inferiores. La osteomielitis se presenta en una tercera parte de los individuos con pie diabético.

La osteomielitis secundaria a una bacteriemia o hematógena, generalmente ocurre en niños entre 3 y 15 años de edad, aunque se puede observar en neonatos o en ancianos. En los niños la infección se localiza en un foco único, habitualmente en la metáfisis de los huesos largos: la metáfisis proximal de tibia y la metáfisis distal del fémur; con menor frecuencia son afectados húmero, peroné, radio y cúbito. (Lew y Waldvogel, 1999; Gómez-Pineda, et al., 2008).

1.1.3 Epidemiología.

En Estados Unidos de América (EUA), *S. aureus* ocupa el segundo lugar después de los estafilococos coagulasa negativa como causa de bacteriemia adquirida en el hospital y es una causa potencial en las infecciones. En México, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) notificó que los porcentajes de mortalidad entre pacientes infectados con *S. aureus* varían entre 5 y 70% y que los porcentajes de mortalidad atribuibles pueden ser elevados (50%) (Velázquez-Meza, 2005).

La prevalencia de la osteomielitis en EUA es de 1 por cada 5000 niños. La prevalencia neonatal es de aproximadamente 1 por 1000, la osteomielitis en pie después de la punción puede ser tan alto como del 16% (30-40% en pacientes con diabetes). La osteomielitis afecta a cerca de dos de cada 10000 personas. La incidencia global es mayor en los países en desarrollo. La morbilidad puede ser importante y puede incluir propagación de la

infección asociada a los tejidos blandos o articulaciones; evolución a la cronicidad de la infección, amputación de la extremidad que participan; infección generalizada, o sepsis. Las tasas de mortalidad son bajas, a menos que la sepsis asociada o en una condición médica grave está presente (King R. <http://www.niams.nih.gov/>).

1.1.4 Respuesta a la infección ósea.

Durante la infección ósea se induce el infiltrado de células inflamatorias y la formación de tejido fibroso como resultado del daño al hueso por el incremento en la resorción y formación de hueso. Algunas citocinas, como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-12 (IL-12) y el factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α) son liberadas localmente durante el proceso infeccioso tanto por células óseas como por células inflamatorias. Estas citocinas han sido caracterizadas como factores osteolíticos. Durante la infección, las células fagocíticas intentan contener a los microorganismos. En este proceso producen radicales de oxígeno y proteínas proteolíticas, que son citotóxicas y que dañan los tejidos circundantes al hueso infectado (Bost et al., 1999). El pus puede diseminarse a los canales vasculares del hueso, incrementando la presión intraósea y dificultando la circulación sanguínea del hueso. Estas dos alteraciones provocan la necrosis del hueso, seguida de la fragmentación de hueso desvascularizado (Cianpolini et al., 2000).

1.1.5 Etiología.

La osteomielitis puede ser causada por una gran variedad de microorganismos como bacterias, hongos o virus. El agente causal más común es el *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Otras bacterias que inducen osteomielitis son: *Haemophilus influenzae* tipo b, principalmente en niños menores de dos años; *Streptococcus* del grupo B en lactantes menores de dos meses y Estafilococos coagulasa negativa en prematuros. *Streptococcus* β hemolíticos se ha observado en casos de osteomielitis por contigüidad o en infecciones mixtas. Las enterobacterias o *Pseudomonas aeruginosa* son comunes en infecciones óseas nosocomiales o secundarias a heridas por punción. *Salmonella sp*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella sp* y *Escherichia coli* causan osteomielitis en pacientes con anemia de células falciformes (Brady et al., 2008).

1.1.6 Diagnóstico.

1.1.6.1 Diagnóstico clínico. Las manifestaciones clínicas varían según la edad, la localización y el tipo de hueso implicado. En general, se caracteriza por dolor constante y signos locales de inflamación, aumento local de la temperatura y edema de tejidos blandos contiguos. En los casos de inoculación a través de zonas de punción esta se encuentra enrojecida y dolorosa. Existe poca o ninguna afectación del estado general y no suele presentarse fiebre. Afecta con mayor frecuencia las extremidades inferiores y la zona de la metafisis. En la fase de bacteriemia puede haber febrícula, fiebre de 40°C y debilidad corporal. Los neonatos y lactantes manifiestan irritabilidad cuando se palpa o moviliza la extremidad afectada y disminución de los movimientos y no suele presentarse fiebre. Los lactantes mayores y niños pequeños presentan dolor, cojera y rechazo a usar el miembro afecto. Lo más

característico es la existencia de un punto sensible y dolor localizado. En niños mayores y adolescentes, generalmente hay menor incapacidad funcional y la zona dolorosa está localizada. Puede acompañarse de cojera moderada (Lew y Waldvogel, 1999 y 2004; Merino et al., 2001).

1.1.6.2 Diagnóstico microbiológico. El aislamiento microbiológico del agente causal de la infección ósea confirma el diagnóstico. El aislamiento del agente causal se puede llevar a cabo en muestras de sangre (osteomielitis hematógena) o biopsias tomadas directamente del hueso infectado (Lew y Waldvogel, 1999 y 2004; Merino et al., 2001).

1.1.6.3 Diagnóstico por imagen. El diagnóstico por imagen de la osteomielitis puede llevarse a cabo por diferentes métodos.

1.1.6.4 Estudios radiográficos. El estudio radiográfico convencional es necesario para el diagnóstico inicial y para el seguimiento de la infección. Los cambios radiográficos en el tejido óseo infectado son evidentes entre los 10 y 21 días del inicio de la infección. En los estudios radiográficos observamos destrucción ósea, engrosamiento del hueso debido a la formación del involucro (reacción perióstica), absceso, osteoesclerosis, secuestro (fragmento de hueso necrótico rodeado de un área de tejido de granulación), reacción endóstica, adelgazamiento de las corticales e inflamación de tejido bland (Lew y Waldvogel, 1999 y 2004; Merino et al., 2001).

1.1.6.5 Gamagrafía ósea. La gamagrafía ósea con tecnecio-99 (Tc-99) revela cambios en la estructura del hueso antes que la radiografía, aunque puede ser negativa en las primeras 48 horas. Puede realizarse con galio-67 o con leucocitos marcados con indio-111 que son isótopos muy sensibles como marcadores de inflamación aguda (Lew y Waldvogel, 1999 y 2004; Merino et al., 2001; Pineda et al., 2006).

1.1.6.6 Ultrasonido. Con este método de diagnóstico se puede apreciar el engrosamiento del hueso y la activación del periostio. Detecta alteraciones en tejidos blandos en 24 horas después del comienzo del proceso infecciosos. En la clínica este procedimiento constituye una técnica rápida e inocua (Pineda et al., 2006; Asociación mexicana de infectología y microbiología clínica, A.C. Infecciones de hueso y articulaciones. <http://www.drscope.com/pac/infecto-1/a3/index.htm>, 1998).

1.1.6.7 Tomografía computarizada. Es útil en osteomielitis para detectar la presencia de secuestros (Lew y Waldvogel, 1999 y 2004; Merino et al., 2001; Pineda et al., 2006).

1.1.6.8 Resonancia magnética nuclear. Este método es útil en el diagnóstico de la osteomielitis vertebral. Arroja datos anatómicos puntuales (Lew y Waldvogel, 1999; 2004; Merino et al., 2001; Pineda et al., 2006).

1.1.7 Tratamiento.

1.1.7.1 Antimicrobiano. Una vez hecho el diagnóstico de osteomielitis, se inicia el tratamiento antibiótico en función de la edad del paciente y sus antecedentes. La duración del tratamiento para las formas no complicadas debe ser de 3 a 6 semanas, comenzando por vía intravenosa para asegurar concentraciones elevadas de antibióticos en el hueso; cuando la respuesta sea favorable (generalmente en una semana) se pasará a la vía oral, utilizando dosis elevadas (dos a tres veces las dosis normales) de antibiótico. Cuando se disponga de cultivos positivos se

modificará la antibioterapia en función de los resultados y sensibilidad de los mismos (Tabla 1) (Lew y Waldvogel, 2004; Lazzarini et al., 2007).

Tabla 1. Antibióticos para el tratamiento de osteomielitis crónica.

Microorganismo aislado	Tratamiento	Alternativas
<i>S. aureus</i> sensible a penicilina	Bencilpenicilina (12-20 millones de unidades)	Cefaxolina (1 g cada 6 h); Clidamicina (600 mg cada 6 h); Vancomicina (1 g cada 12 h)
<i>S. aureus</i> resistente a penicilina	Nafcilina (1.0 ó 1.5 g cada 4-6 h) o Cefaxilina (2 g cada 8 h)	Cefalosporina de segunda generación (cefuroxina); Clindamicina (600 mg cada 6h); Vancomicina (1 g cada 12 h); Ciprofloxacina (750 mg oral cada 12 h); Levofloxacino combinación con rifampicina (600 mg por día)
<i>S. aureus</i> resistente a meticilina	Vancomicina (1 g cada 12 h)	Teicoplanina (400 g cada 24 h, los primeros días cada 12 h)
<i>Streptococcus</i> β -Hemolíticos del grupo B o A	Bencilpenicilina (12-20 millones de unidades)	Clidamicina (600 mg cada 6 h); Eritromicina (500 mg cada 6 h); Vancomicina (1g cada 12 h)
Bacilos entéricos gramnegativos	Quinolonas (Ciprofloxacina 750 mg oral cada 12 h)	Cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona 2 g cada 24 h)
<i>Serratia sp, Pseudomonas aeruginosa</i>	Piperacilina (2-4 g cada 4 h) y aminoglucósidos	Cefepime 2 g cada 12 h o quinolonas y aminoglucósidos (de acuerdo con la sensibilidad)
Anaerobios	Clidamicina (600 mg cada 6 h)	Ampicilina-sulbactam (2 g cada 8h); Metronidazol para anaerobios gramnegativos (500 mg cada 8 h)
Infección polimicrobiana (aerobios y anaerobios)	Ampicilina-sulbactam (2 g cada 8 h)	Imipenem (500 mg cada 6 h)

1.1.7.2 Coadyuvantes. Analgésicos y antiinflamatorios, inmovilización y una adecuada hidratación y nutrición.

1.1.7.3 Quirúrgico. Está indicado si hay signos clínicos y/o radiológicos de colección purulenta. Todos los casos de osteomielitis crónica requieren tratamiento antimicrobiano y sólo algunos de ellos necesitarán además tratamiento quirúrgico (Pineda et al., 2006). En algunos casos de osteomielitis aguda el manejo quirúrgico es necesario,

principalmente para descomprimir el hueso y mejorar la circulación o bien para el drenaje de material purulento. Quitar una ventana cortical en la región metafisiaria, permitirá descomprimir los abscesos intramedulares y extraer el tejido óseo secuestrado. Los procedimientos de revascularización son necesarios para disminuir la posibilidad de recurrencia de la infección. Después de la debridación es necesario cubrir la herida con injertos de piel, hueso o músculo. Al tratar una fractura infectada no consolidada, el objetivo es practicar debridación y cierre de tejidos blandos, después de seis a 12 semanas de que desapareció todo signo de infección (Asociación mexicana de infectología y microbiología clínica, A.C. Infecciones de hueso y articulaciones. <http://www.drscope.com/pac/infecto-1/a3/index.htm>, 1998).

1.1.8 Modelos animales de osteomielitis.

Se han empleado diferentes especies animales (conejos, perros, cobayos, pollos y ratas), vías de inoculación (intravenosa, local, dentro de la cavidad medular, por medio de un agujero en la cortical de tibias, fracturas, esponjas impregnadas de microorganismo colocadas en la cavidad medular, clavos con bacteria, etc.) y concentraciones variadas de inóculos con y sin el uso de agentes esclerosantes (morruato de sodio, ácido araquidónico o sulfato de bario) para generar modelos de estudio de la patogenia, diagnóstico y tratamiento de la osteomielitis. Estos estudios se han llevado a cabo por diversos grupos de investigadores (Rodent 1884, Starr 1922, Thompsonm 1934, Dubos 1938, Sheman 1941, Stevens 1966, Norden y Kennedy 1970, Rissing 1970, Denysine 1983, Mader y Wilson 1986 , Fhischer 1996, Smeltzer 1997, Chanda 1999) a lo largo de varias décadas (Gomis et al., 2000).

Estos modelos se correlacionan con la osteomielitis en humanos en cuanto a su cronicidad y en cambios radiológicos e histológicos. Los estudios de modelos animales de osteomielitis sugieren que la enfermedad crónica puede ser generada por medio de la aplicación de un inóculo grande, empleando agentes esclerosantes que bloqueen la irrigación del hueso, colocando implantes con bacteria y por medio de esponjas con bacteria. Con los modelos se han investigado diferentes hipótesis sobre la patogenia de la infección, caracterización de los parámetros de infección ósea, participación de diferentes microorganismos, papel que juega el sistema inmune en el control de la infección ósea y la estandarización de métodos diagnósticos por imagenología. (Gomis et al., 2000; Monzón et al., 2002; Spangolo et al., 1993; Rissing et al., 1985; Lucke et al., 2003).

1.1.8.1 Modelos de osteomielitis en rata Wistar. La rata Wistar como modelo de osteomielitis experimental, se caracteriza por ser un modelo económico, reproducible, de fácil manejo en cuanto a la realización de procedimientos quirúrgicos y su mantenimiento antes y después de la inoculación de la infección (curación, alimentación y limpieza). En el Servicio de Bioquímica del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) se desarrolló un modelo de osteomielitis en tibia de rata de 500 a 600 g de pc, estas ratas fueron inoculadas con 39×10^6 UFC de la cepa de *S. aureus* 76 IQM que resultó ser muy virulenta, en este modelo no hubo la necesidad de utilizar algún agente esclerosante (Rissing et al., 1985 a y b; Littlewood-Evans et al., 1997; Faber et al., 2005; Rouse et al., 2006), el modelo reprodujo una infección ósea con las características clínicas, radiológicas e histológicas de osteomielitis en humanos (Hernández-Arellano, 2005).

1.2 Leptina

1.2.1 Generalidades.

La leptina es un péptido de 16 kDa, está constituido por 146 aminoácidos. Se conocen 6 isoformas del receptor que son producto de combinaciones de diferentes segmentos del gen. Pertenecen a la familia de receptores de citocina clase I, que también incluye a los receptores de interleucina-6 (IL-6) y al factor estimulante del crecimiento de colonias de granulocitos (G-CSF). La leptina es una hormona pleiotrópica que se produce principalmente en el tejido adiposo blanco, aunque se ha encontrado que otros órganos también la producen como el hipotálamo, hipófisis, placenta, músculo esquelético, mucosa gástrica, epitelio mamario y hueso. La regulación de la expresión depende de manera importante de los depósitos grasos del organismo (Houseknecht, et al., 1998; Matarese et al., 2005).

1.2.2 Balance energético y alimentación.

El papel más estudiado de la leptina es en la regulación del peso corporal, el órgano involucrado en esta función es el hipotálamo. La leptina es una señal de escasez, un descenso en la concentración de leptina conduce a cambios que intentan preservar las reservas de energía para funciones vitales. Durante un periodo de ayuno y tras una reducción de grasa corporal, hay un descenso en los niveles de leptina que conducen a una reducción en el gasto total de energía y así proporcionar suficiente energía que garantice el funcionamiento de los órganos vitales como el cerebro, el corazón y el hígado. Estos efectos en el descenso de leptina que mejoran las opciones de supervivencia bajo condiciones de hambruna pueden conducir a la inmunosupresión entre otras alteraciones. Se ha visto en estudios en ratones carentes del gen y en niños malnutridos una alteración en el sistema inmune asociada a los niveles de leptina (Houseknecht, et al., 1998).

1.2.3 Sistema inmune e inflamación.

La leptina participa en procesos inflamatorios y modifica la respuesta inmune (Faggioni et al., 2001). Se han encontrado alteraciones en la inmunidad e inflamación en animales deficientes de leptina o de su receptor (Fantuzzi y Faggioni, 2000). La leptina participa en el desarrollo, la proliferación, la apoptosis, la maduración y la activación de casi todas las células involucradas en la inmunología celular, regulando tanto la respuesta inmune innata como adaptativa (Matarese et al., 2005). Modula la respuesta inmune en la compleja red de respuestas a la infección/inflamación (Lago et al., 2007). Se ha estudiado la acción bactericida de la leptina (Caldefie-Chezet et al., 2001), aunque no está completamente clara ya que en estudios en un modelo de artritis séptica no se vio afectada la mortalidad de la bacteria al aplicar leptina, aunque disminuyó la intensidad de la infección (Hultgren et al., 2001).

1.2.4 Acción sobre el hueso.

La leptina actúa sobre el metabolismo óseo (Zhang et al., 1994). La acción sistémica de la leptina sobre el metabolismo óseo resulta en el aumento en la masa mineral ósea (Burguera et al., 2001) y promueve la proliferación de osteoblastos (Gordeladze et al., 2002). Los osteoblastos mismos expresan leptina (Reseland et al., 2001) y el receptor de leptina (Lee et al., 2002). La acción a nivel del sistema nervioso central tiene efecto antiosteogénico (Ducy et al., 2000), e inhibe la osteoclastogénesis (Holloway et al., 2002) y también se ha encontrado que inhibe la apoptosis de los osteoblastos e incrementa la mineralización (Gordeladze et al., 2002).

1.3 Osteomielitis y leptina.

En el Servicio de Bioquímica INR se estudió el efecto de la leptina sobre un modelo de fractura quirúrgica con un proceso infeccioso no controlado, en donde se observó que los animales tratados con leptina consolidaron a diferencia de los no tratados (Franco-Bourland y Vergara-Fernández, 2003). Este estudio sugirió que la leptina acelera la consolidación ósea, que esta consolidación pudiera atribuirse a que disminuye el proceso infeccioso inflamatorio y que además promueve la cicatrización de la piel. A partir de estos resultados nos surgió el interés por investigar la acción de la leptina sobre un modelo de osteomielitis.

II JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La osteomielitis es una enfermedad desgastante, costosa y de difícil tratamiento. Es importante tener alternativas para el mejor manejo de la osteomielitis que faciliten el tratamiento y disminuyan el tiempo de recuperación.

En los modelos animales de osteomielitis se reproducen las características de la enfermedad en humanos, en estos modelos se estudian alternativas de tratamiento, que en un momento dado pueden aplicarse a la osteomielitis en humanos.

En el Servicio de Bioquímica nos interesó investigar la acción de la leptina sobre un modelo de osteomielitis controlada en tibia de rata Wistar generado con un inóculo de *S. aureus* proveniente de un aislado clínico.

III HIPÓTESIS

La administración local de leptina a una tibia de rata con osteomielitis estafilocócica podría disminuir la intensidad de la infección.

IV OBJETIVO GENERAL

Investigar el efecto de la administración local de leptina en el desarrollo de la osteomielitis en tibia de rata generado por medio de una cepa de *S. aureus* aislada de un paciente con osteomielitis crónica.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Reproducir el modelo de osteomielitis en la tibia de la rata y caracterizarlo mediante datos clínicos, radiológicos, bacteriológicos e histopatológicos.
2. Generar un modelo de osteomielitis en tibia de rata con diferentes concentraciones de inóculo bacteriano y caracterizarlo mediante datos clínicos, radiológicos, bacteriológicos e histopatológicos.
3. Investigar el efecto local de la leptina administrada en ratas con osteomielitis.

V MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Diseño del estudio

5.1.1 Animales.

Se utilizaron en total 27 ratas macho Wistar de 300 a 340 g de peso corporal (pc) para la realización de dos experimentos. Las ratas fueron donadas por el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Su manejo y mantenimiento se realizó con estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el uso de animales de laboratorio.

5.1.2 Mantenimiento de ratas a su ingreso al bioterio.

A su llegada al bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación fueron puestas en cuarentena (8 días). Durante este periodo monitoreamos su ingesta de alimento, agua y pc. Las ratas se colocaron en jaulas de policarbonato (no más de 3 ratas por caja). Se mantuvieron a una temperatura ambiente entre 20 y 22°C, con ciclos de luz oscuridad de 12 h y fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta comercial estandarizada Harlan 2018S.

5.1.3 Cepa.

La cepa de trabajo de *S. aureus* 76 IQM utilizada fue obtenida de un aislado clínico de un paciente con osteítis. Expresó las adhesinas codificadas por *cna*, región A de *cna* y *map*; mostró adherencia con alta y baja afinidad a colágena tipo I, II, V, VII, así como, adherencia a fibronectina y laminina. Fue coagulasa positiva, catalasa positiva y mostró beta hemólisis. La actividad enzimática extracelular fue: lipasa negativa y DNAasa negativa. Fue oxidasa negativa y se caracterizó por su alta expresión de proteinasas (gelatinolítica, caseinolítica y colagenolítica) y fosfatasa ácida resistente a tartrato (Martínez-Canseco, 1999 y Hernández-Arellano, 2005).

5.1.4 Experimento I: Osteomielitis en tibias de ratas: inoculación con concentraciones decrecientes de *S. aureus* 76 IQM.

Quince ratas fueron divididas en 2 grupos:

5.1.4.1 Grupo de ratas control: 5 ratas fueron inoculadas con vehículo [agar-agar bacteriológico (agar-agar) 0.4%].

5.1.4.2 Grupo de ratas infectadas: 10 ratas fueron inoculadas con concentraciones decrecientes de bacteria 39, 19, 9, 4, 2 y 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa de *S. aureus* 76 IQM en agar-agar al 0.4%, para conocer la extensión y graduación de la lesión radiológica.

Del grupo de ratas infectadas se escogió la concentración de bacteria que utilizamos para el seguimiento de la leptina sobre la osteomielitis.

5.1.4.3 Diseño de escala radiográfica semicuantitativa para la valoración de la intensidad de la osteomielitis en tibia y peroné. A partir de radiografías de tibias con osteomielitis determinamos los parámetros de infección y desarrollamos una escala semicuantitativa para valorar la intensidad de la infección.

5.1.5 Experimento II: Valoración de la leptina administrada a ratas con osteomielitis en tibia con *S. aureus* 76 IQM.

Determinar el efecto de la leptina administrada localmente en la extremidad con *S. aureus* 76 IQM.

Doce ratas fueron divididas en 3 grupos:

5.1.5.1 Grupo de ratas control: 2 ratas fueron inoculadas con vehículo (agar-agar 0.4%).

5.1.5.2 Grupo de ratas infectadas no tratadas: 5 ratas infectadas con un inóculo bacteriano de 1×10^6 UFC en agar-agar al 0.4% por 30 días.

5.1.5.3 Grupo de ratas infectadas y tratadas: 5 ratas infectadas con un inóculo bacteriano de 1×10^6 UFC en agar-agar al 0.4% y administración local (tibia infectada) de leptina ($8 \mu\text{g}/\text{día}/30$ días) a partir del día de la inoculación.

5.1.5.4 Valoración de la intensidad de la osteomielitis. Por medio de la escala radiográfica diseñada en el experimento I, valoramos la intensidad de la infección en ratas no tratadas y tratadas con leptina. A los valores que resultaron se les aplicó la prueba estadística de t de Student.

5.2 Control de fuentes de error

Se descartaron aquellas ratas que se encontraban enfermas (no suben de peso, no comer, no beber agua, están quietas, decaídas o con alguna lesión). Cuando fue necesario se les aplicó en el agua de beber Tylexin (solución para uso veterinario, Tornel, S.A.) a una dosis 1.8 mL/500 mL por 5 días durante la cuarentena. Las ratas fueron manipuladas solo por nosotros durante todo el experimento. Se cambió agua y cama cada tercer días. Se registró el comportamiento y evolución de la infección de cada animal.

5.3 Modelo de osteomielitis en tibia de rata (experimento I)

Se emplearon en total 15 ratas: 5 fueron inoculadas con agar-agar al 0.4% y 10 recibieron concentraciones decrecientes de bacteria de la cepa de *S. aureus* 76 IQM.

5.3.1 Infección de las tibias.

La infección en la tibia de rata se indujo inoculando la cepa de *S. aureus* 76 IQM en tibias de rata.

5.3.1.1 Recuperación, purificación y caracterización bioquímica de la cepa de trabajo.

Para la inoculación de las tibias se recuperó y caracterizó la cepa de trabajo. Se utilizó una solución al 10% de hipoclorito de sodio para la limpieza del área de trabajo antes y después de la manipulación de la cepa.

5.3.1.1.1 Utilizamos el medio agar-sangre con eritrocitos de carnero (agar-sangre) para la recuperación, purificación y caracterización bioquímica de la cepa.

Este medio se utiliza para aislar, cultivar y estudiar reacciones hemolíticas. Las características del cultivo de *S. aureus* en este medio son: colonias opacas, lisas, convexa, de color blanco a amarillo y rodeadas de una zona clara, en la cual los eritrocitos están lisados por la β -hemólisis.

5.3.1.1.2 Recuperación. Se tomó una asada de una caja de agar-sangre (Becton Dickinson; BD) almacenado en refrigeración (7 de marzo 2006, Carlos Martínez), se sembró por estría en agar-sangre y se incubó a 37°C por 24 h en una incubadora bacteriológica (Fisher Scientific; Isotemp).

5.3.1.1.3 Purificación. Para descartar su contaminación durante el almacenaje, se purificó una colonia del cultivo fresco de la cepa recuperada en agar-sangre. La colonia se sembró en agar-sangre por estría (se hicieron 3 estrías, diluyendo la muestra de una estría a la otra) y se incubó a 37°C por 24 h en la incubadora bacteriológica.

Las características microbiológicas de la cepa en agar-sangre fueron: colonias brillantes, húmedas, convexas con hemólisis- β alrededor de las colonias (Figura 2).

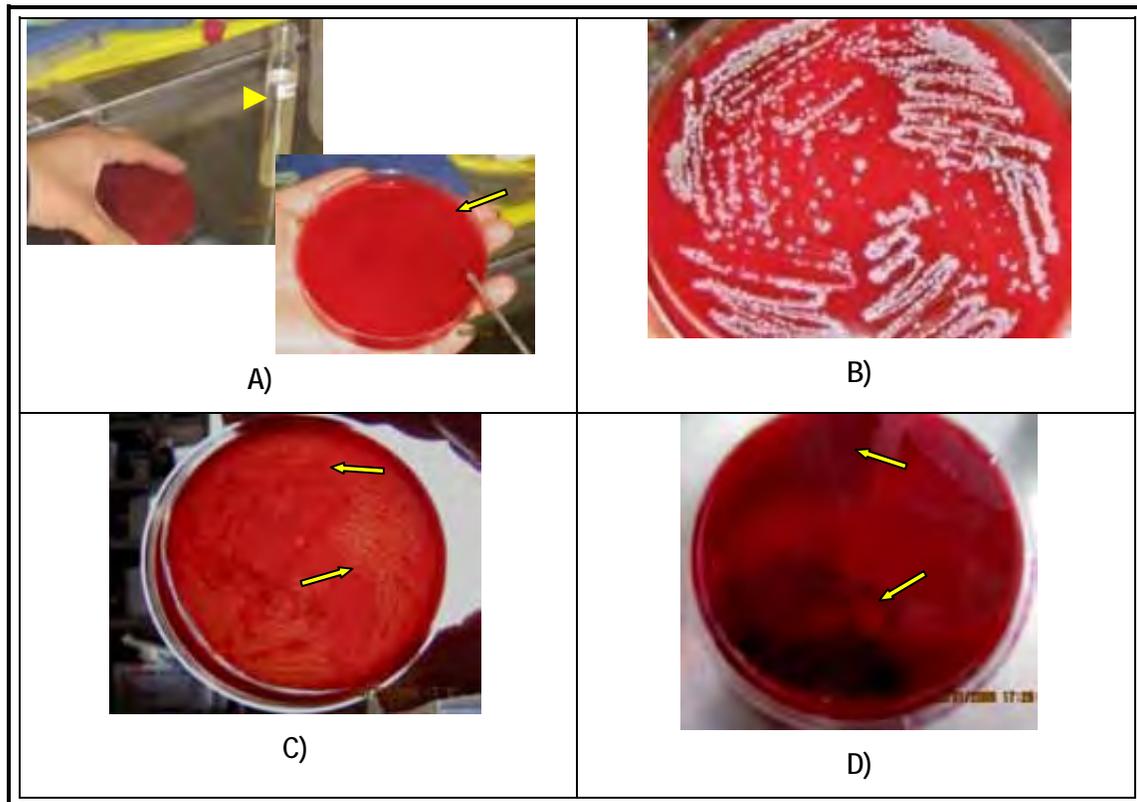


Figura 2. Recuperación de la cepa de *S. aureus* 76 IQM. A) Cepa refrigerada () y recuperación de la cepa por siembra en agar-sangre (); B) crecimiento de la cepa en agar-sangre; C) las () señalan la hemólisis- β alrededor de las colonias y D) vista posterior de la caja en C: el color oscuro también indica hemólisis ().

5.3.1.1.4 Determinación del estado de pureza. Para asegurarnos de la pureza de la cepa recuperada, se sembró una colonia a partir del cultivo de recuperación en agar-sangre. Con una asa estéril se tomó la colonia, se sembró por estria nuevamente en agar-sangre y se incubó a 37°C por 24 h (Figura 3 A). Se observó un halo transparente alrededor de las colonias (hemólisis- β). Las colonias lucieron brillantes (tono gris-plateado-nacarado), húmedas y convexas, con un fenotipo homogéneo que prueba su estado de pureza. A partir de este cultivo se tomaron muestras para su caracterización bioquímica (Figura 3 B).



Figura 3. Determinación del estado de pureza en agar-sangre. A) La flecha señala la colonia a partir de la cual se determino el estado de pureza de la cepa 76 IQM; B) siembra por dilución por estría (3) de la colonia seleccionada en A; C) crecimiento de la cepa sembrada en B a 37°C por 24 h, demostración del estado de pureza (homogeneidad del fenotipo de la cepa) y D) vista posterior de la caja en C.

5.3.1.1.5 La cepa fue sometida a pruebas de caracterización bioquímica e identificación:

5.3.1.1.5.1 Coagulasa, para la prueba de coagulasa (coágulo positivo) utilizamos plasma de humano (donado por el Laboratorio Central del INR). Por duplicado se colocó una asada de bacteria en 400 μL de plasma humano. Las muestras se incubaron a 37°C por 2 h en un termoblock (Lab-line Instruments Inc. No. 2093);

5.3.1.1.5.2 Catalasa, una asada de la bacteria se distribuyó sobre una laminilla y se añadieron 40 μL de H_2O_2 al 3% comercial. El resultado positivo, consistió en la liberación burbujas de O_2 . La catalasa transforma al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno: $\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

5.3.1.1.5.3 Cultivo en agar-sal y manitol, se tomó una asada de la cepa y se sembró por estría en agar-sal y manitol (Becton Dickinson; BD). Se incubó por 24 h a 37°C en la incubadora bacteriológica. En la prueba positiva para *S. aureus* observamos crecimiento de colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo color. El manitol es el único azúcar fermentado por las cepas patógenas de este género bacteriano. La producción de ácido proviene de la fermentación del manitol y es detectada por el viraje del indicador de pH; rojo de fenol de rojo a amarillo;

5.3.1.1.5.4 Cultivo en agar-eosina azul de metileno, se tomó una asada de la cepa y se sembró por estría en agar-eosina azul de metileno (Becton Dickinson; BD). Se incubó por 24 h a 37°C en la incubadora bacteriológica. El medio es selectivo y diferencial para los organismos gramnegativos. *S. aureus* muestra colonias puntiformes o no crece;

5.3.1.1.5.5 Cultivo en BBL CHROM-agar, se tomó una asada de la cepa y se sembró por estría en BBL CHROM-agar (*S. aureus*; Becton Dickinson; BD). Se incubó por 24 h a 37°C en la incubadora bacteriológica. Para el aislamiento y diferenciación directa de *S. aureus* cuyas colonias son de color malva.

La cepa 76 IQM es coagulasa (+), catalasa (+), utiliza el manitol (+) (Figura 4 A, B y C), el empleo de un panel para grampositivos del sistema de identificación MicroScan mostró que la cepa de *S. aureus* 76 IQM es *S. aureus*, con el biotipo 317377 y ser susceptible a la mayoría de los antibióticos estudiados: Cefalotina, cefazolina, cefotaxima,

ciprofloxacina, claritromicina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, imipenem, nitrofurantoina, norfloxacina, oxacilina, rifampina, tetraciclina, trimetoprim/sulfametoxazol y vancomicina, fue resistente a amoxicilina/Ac. clavulánico y penicilina (Figura 4 D).

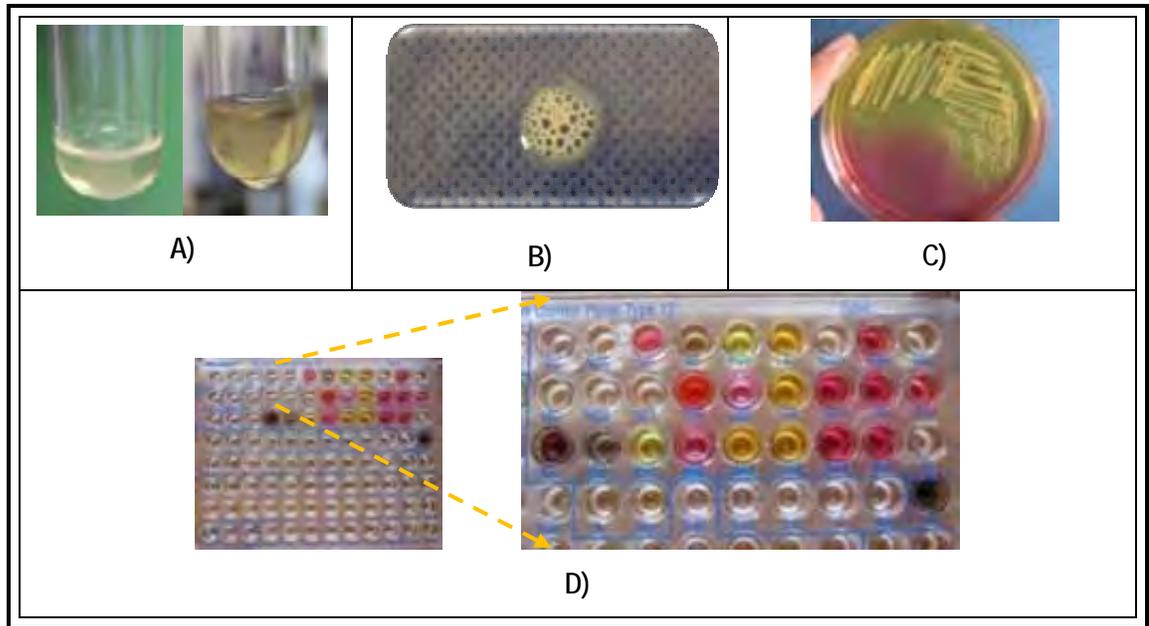


Figura 4. Caracterización bioquímica de la cepa 76 IQM de *S. aureus*. A) Coagulasa positiva; B) catalasa positiva; C) cultivo en agar-sal y manitol positivo y D) placa reactiva de MicroScan para grampositivos.

5.3.1.1.5.6 MicroScan para el análisis de Gram positivas, el MicroScan es un sistema de identificación semiautomatizado que consiste en una placa con pruebas miniaturizadas microbiológicas y sensibilidad a algunos antimicrobianos para la identificación y caracterización de cepas Gram positivas y catalasa positivas. Se tomó una asada de la cepa y se sembró en agar-sangre a 37°C en la incubadora bacteriológica por 24 h. Se tomó la muestra con un capilar estandarizado (dilución 0.5 de MacFarland, equivalente a 1.5×10^8 UFC) y se diluyó en 30 mL de agua destilada. Se vertió esta suspensión en una placa de varios carriles de donde tomaron 48 alícuotas con la pipeta multicanal del equipo y se colocaron en la placa de pozos reactivos para las pruebas bioquímicas y de resistencia a antibióticos. La placa se incubó a 37°C por 24 h en una incubadora bacteriológica al término de los cuales se le añadió a algunos pozos revelador específico para las pruebas. La placa se dejó a temperatura ambiente por 5 min y se leyó en el instrumento MicroScan auto SCAN4, Dade Behring, con el protocolo para grampositivos y catalasa positiva (Figura 5).

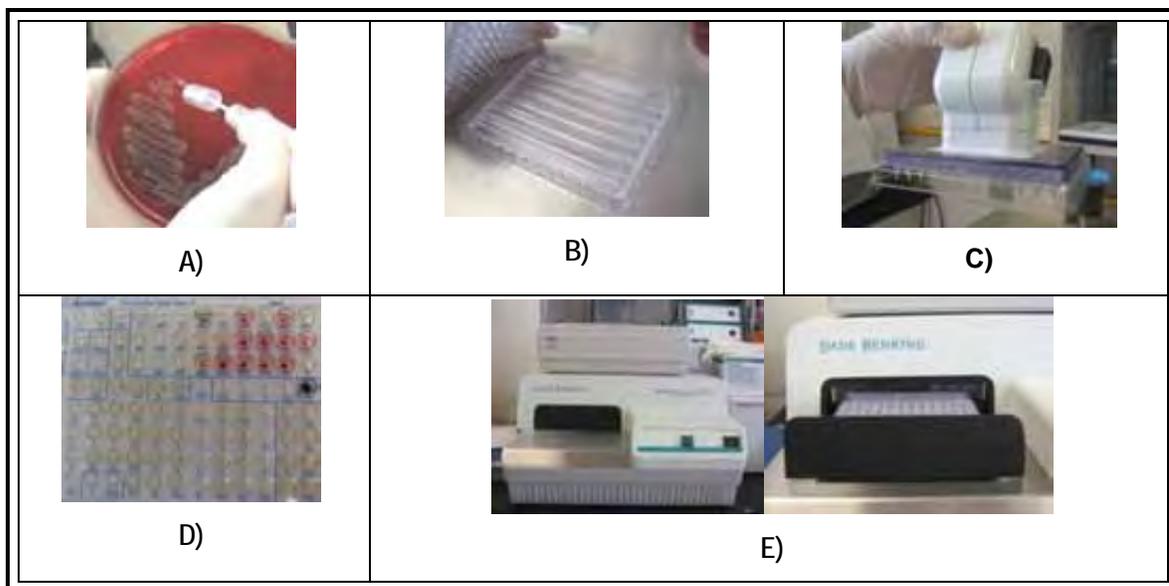


Figura 5. MicroScan para el análisis de grampositivos. A) Toma de muestra de cultivo en agar-sangre con capilar estandarizado; B) placa de varios carriles de donde tomaron las alícuotas; C) pipeta multicanal del equipo; D) placa multipozos con las muestras y E) MicroScan autoSCAN4 en donde se leyó la placa.

5.3.1.2 Almacenamiento de la cepa recuperada: Cepa de trabajo. Se colocaron en dos tubos de vidrio con tapón de rosca y base plana de (16 X100 mm), 10 mL de agar-peptona de caseína-peptona de harina de soya (agar-CASOY; MERCK). Se esterilizaron por 15 min a 121°C en una autoclave a vapor en forma de olla no eléctrica (autoclave). Se colocaron en una superficie inclinada hasta su solidificación. Posteriormente se incubaron a 37°C por 18 a 24 h para prueba de esterilidad. Se tomó una asada de la cepa y se sembró por estría en la superficie del agar y se incubó a 37°C por 24 h. Al término se almacenaron los tubos en refrigeración (4-8°C) (Figura 5 A, B y C).

Cepa de reserva. En 4 mL de caldo-CASOY se sembró una asada de bacteria y se incubó por 24 h a 37°C en la incubadora bacteriológica. Por cada criotubo de almacenamiento se colocaron 0.75 mL del cultivo bacteriano y se agregaron 0.25 mL de glicerol estéril (AMRESCO). Se mezclaron cuidadosamente y se almacenaron a -20°C (Figura 6 A y D).

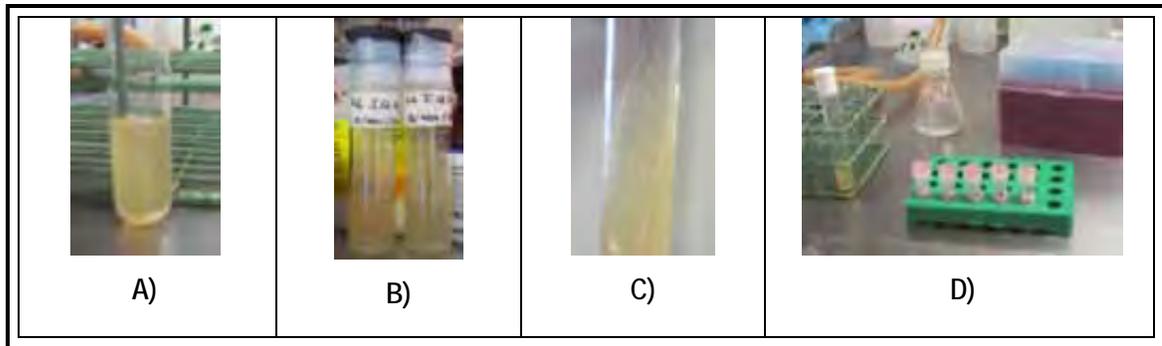


Figura 6. Almacenamiento de la cepa recuperada. A) Suspensión de la cepa de trabajo después de 24 h de cultivo a 37°C en caldo-CASOY para su almacenamiento en B) como cepa de trabajo y D) como cepa de reserva; B) cepa de trabajo, en refrigeración a 4-8°C; C) acercamiento a la cepa de *S. aureus* 76 IQM del cepa de trabajo y D) cepa de reserva a -20°C.

5.3.1.3 Cuenta de unidades formadoras de colonias (cuenta viable): Cajas con agar-CASOY. Se preparó agar-peptona de caseína-peptona de soya (agar-CASOY) a una concentración de 40 g/L con agua bidestilada. Se esterilizó por autoclave por 15 min a 121°C. Se colocaron 10 mL del agar por caja petri (cajas de plástico estériles desechables de 100 X 15 mm, Becton Dickinson; BD), se dejaron solidificar a temperatura ambiente y se comprobó su esterilidad incubando las cajas a 37°C por 24 h.

5.3.1.3.1 Caldo-CASOY. Se preparó caldo-CASOY a una concentración de 30 g/L en agua bidestilada. Enseguida se esterilizó por autoclave por 15 min a 121°C y se guardó en refrigeración (4-8°C).

5.3.1.3.2 Agar-agar al 0.7%. Se preparó agar-agar (MERCK) al 0.7% y se alicuotó en tubos de vidrio con tapón de rosca de 5 mL. Se esterizaron en autoclave por 15 min a 121°C. Finalmente se almacenaron en refrigeración (4-8°C).

5.3.1.3.3 Cultivo de la cepa 76 IQM. En 10 mL de caldo-CASOY se sembró una asada de bacteria y se incubó por 24 h a 37°C.

5.3.1.3.4 Cuenta viable. Se centrifugó el cultivo de la cepa a 700 xg por 5 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla bacteriana se resuspendió en 150 µL de solución salina amortiguada con fosfatos pH 7.2 estéril (PBS; AMRESCO); la suspensión bacteriana, se ajustó a una concentración (turbidez) de 2.0 de absorbencia (Abs) a 600 nm en el espectrofotómetro Beckman DU 640 (Figura 7 A, B y C): partiendo de ésta suspensión se realizaron 8 diluciones seriadas 1:10. De las tres últimas diluciones se tomaron 100 µL de cada tubo y se mezclaron con 3 mL de agar-agar al 0.7%, que se sembraron por vaciado en cajas con agar-CASOY, se incubaron a 37°C y se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) que crecieron al término de 24 h.

La cuenta de UFC se realizó por cuadrantes y se calculó el número de UFC en 10 µL (Figura 7 E, F y G). En promedio en la dilución 6, el número de UFC fue de 39×10^6 UFC/10 µL.

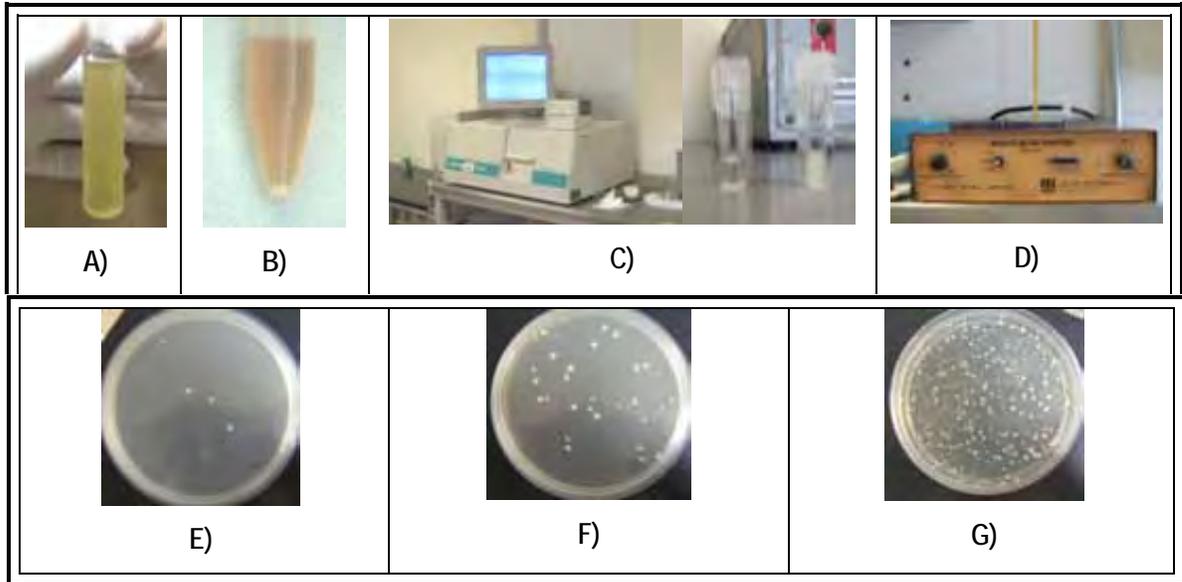


Figura 7. Cuenta viable y preparación del inóculo. A) Crecimiento de la cepa 76 IQM después de 24 h de cultivo a 37°C; B) pastilla de bacterias después de la centrifugación; C) ajuste a 2.0 Abs a 600 nm; D) el inóculo se mantuvo en un termoblock a una temperatura de 45°C hasta su aplicación en la tibia de la rata; E) UFC en la dilución 8; F) UFC en la dilución 7 y G) UFC en la dilución 6.

5.3.1.4 Procedimiento de inoculación de las tibias. Probamos inóculos con concentraciones decrecientes de bacteria de 39, 19, 9, 4, 2 a 1×10^6 UFC, para conocer la extensión y graduación radiológica de la lesión, así como la concentración de bacteria para uso en el experimento II.

5.3.1.4.1 Inóculos bacterianos. Diez μL de las preparaciones (procedimiento experimento II en cuenta viable) de bacteria, se mezclaron con 10 μL de agar-agar 0.8% y se mantuvieron a 45°C (termoblock) hasta el momento de su inoculación (Figura 4 A, B, C y D).

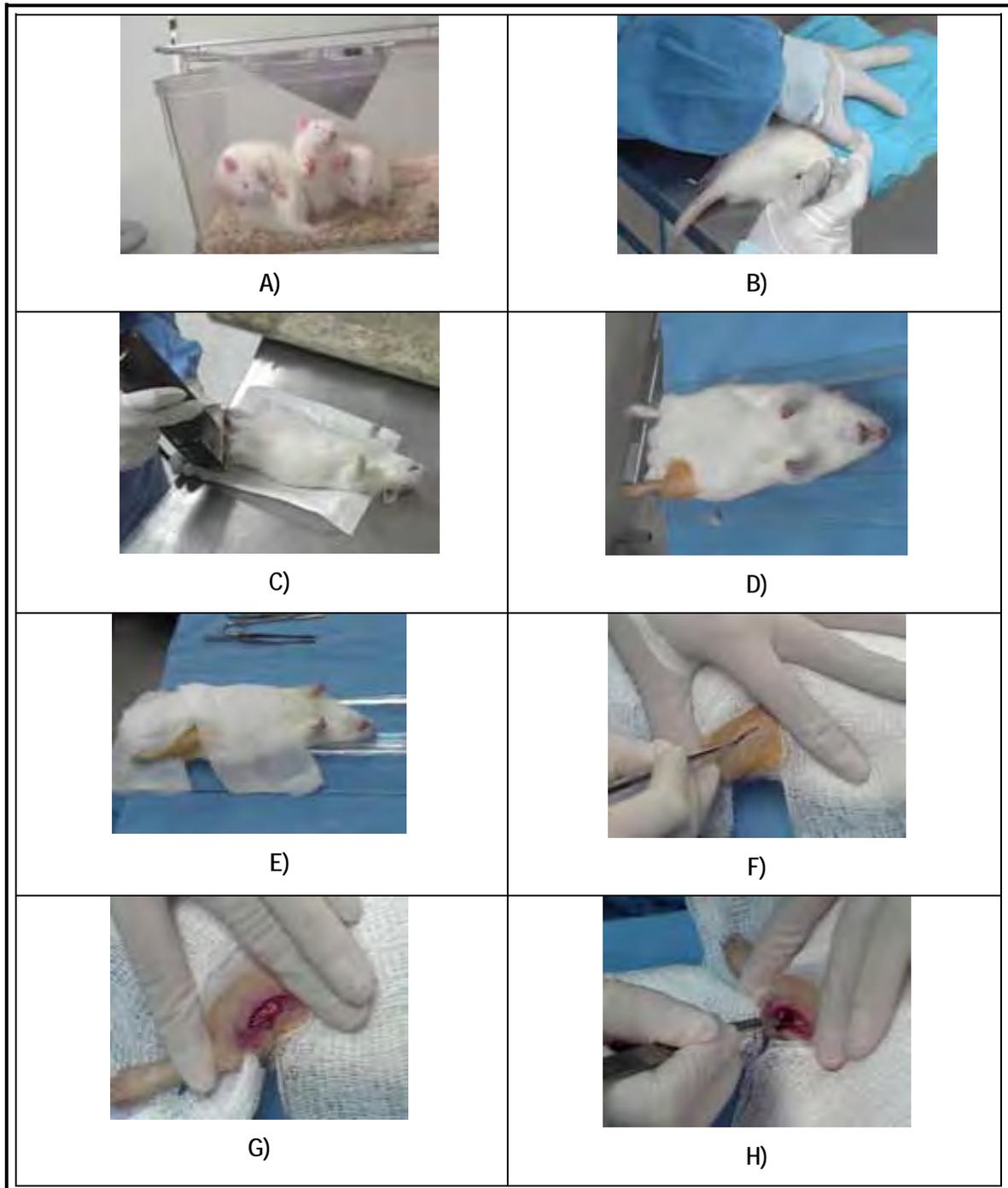
El agar-agar se emplea para disminuir el riesgo de fuga de la bacteria del hueso y su difusión a los tejidos blandos.

5.3.1.4.2 Animales y anestesia. Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de xilazina (13 mg/kg pc) y ketamina (87 mg/kg pc) por vía intramuscular (Franco-Bourland RE, 1998).

5.3.1.4.3 Inoculación de bacteria en tibia. Se preparó la piel de la extremidad posterior a intervenir, rasurando el área quirúrgica (rasuradora Oster) y lavando con yodo. Se acomodó al animal en un soporte de acrílico en decúbito dorsal y se colocaron gasas estériles alrededor del miembro desinfectado (Hernández-Arellano, 2005).

Se hizo una incisión de aproximadamente 1.5 cm en la piel y se expuso la articulación de la rodilla retrayendo el tendón rotuliano con una sutura y se disecó cuidando de no dañarlo; se realizó una perforación guía con un clavo de Kirschner de 0.045 pulgada (Solco de México) y un taladro manual de Jacobs. Se tomó una placa radiográfica para asegurarnos de la colocación del clavo dentro del canal medular. Se retiró el clavo y se limpió el área hasta que dejó

de sangrar. En el canal medular se colocaron 20 μ L de la mezcla del inóculo bacteriano/agar-agar 0.4% con una jeringa Hamilton de 50 μ L. las ratas control solo recibieron el vehículo. Se selló el orificio con cera ósea, se suturó la piel con Nylon 3-0 (Ethicon) y se realizó el estudio radiográfico basal de la tibia (Figura 8). [El procedimiento de inoculación se practicó previamente empleando 15 ratas de desecho (400 a 560 g de pc) con 20 μ L de una mezcla de Ba₂SO₄ (medio de contraste no iodado) al 60% en agar-agar al 0.4%].



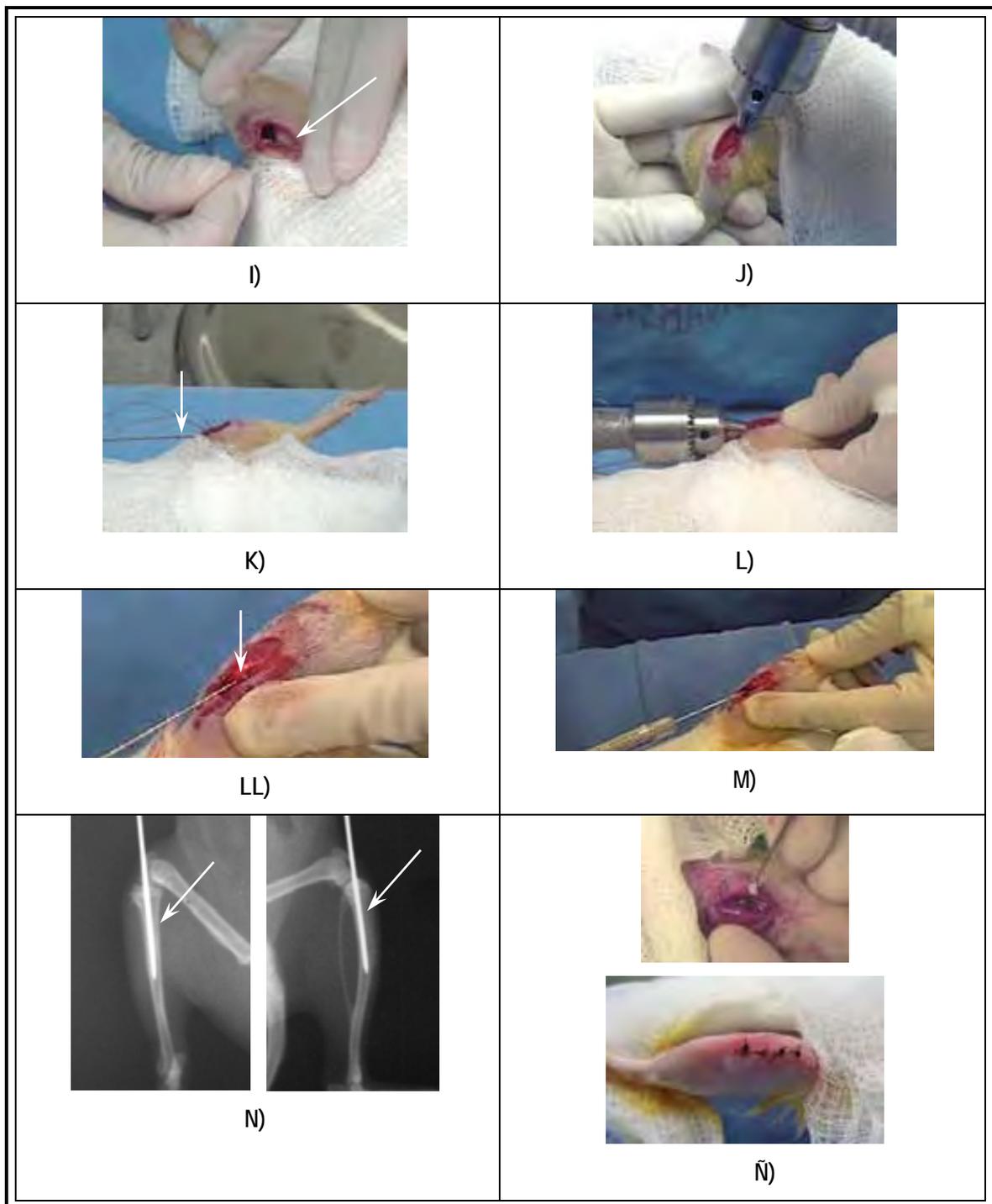


Figura 8. Inoculación de la bacteria en la tibia. A) Ratas macho Wistar; B) aplicación del anestésico, C) rasurado de la extremidad a intervenir; D) lavado con yodo; E) extremidad aislada con gasas estériles; F) incisión; G) aislamiento de tendón rotuliano; H) disección de tendón rotuliano; I) tendón rotuliano separado; J) perforación con el clavo empleando el taladro de Jacobs; K) marca en el clavo señalando hasta donde se introduce dentro del canal medular; L) colocación del clavo dentro del canal medular hasta la marca empleando el taladro de Jacobs; LL) clavo dentro del canal medular; M) inoculación bacteriana; N) estudio cráneo-caudal y medio-lateral de tibia de rata, las flechas indican el clavo dentro del canal medular; Ñ) colocación de cera ósea y sutura de la piel.

5.3.1.4.4 Mantenimiento de las ratas infectadas. Se colocaron en jaulas de policarbonato individuales y aisladas. La limpieza y desinfección del cuarto de alojamiento y de los anaqueles, se realizó cada tercer día empleando hipoclorito de sodio al 10%, el cambio de cama y la desinfección de las cajas se efectuó cada tercer día empleando hipoclorito de sodio al 50% (Primer Congreso de Protección Civil Hospitalaria, 2007). Una vez infectadas las ratas, sus desechos se eliminaron en bolsas rojas de acuerdo a la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002 de Protección Ambiental-Salud, Ambiental-Residuos Peligrosos y Biológicos Infecciosos, Clasificación y Especificaciones de Manejo.

5.3.2 Aproximación clínica a la infección.

Durante el transcurso del experimento se registraron las condiciones generales de salud de las ratas por medio de videos y fotografías. Las ratas se pesaron a los 15 y 30 días posinoculación. Se valoraron la marcha (claudicación, apoyó, función del miembro inoculado y observaciones generales) y el estado de la extremidad inoculada (abscesos, lesiones, supuración, edema, calor y observaciones generales).

5.3.3 Estudio radiográfico.

Para seguir el curso de la infección se realizaron los estudios radiográficos el día de la infección y a los 15 y 30 días posinoculación. Los estudios se llevaron a cabo en las instalaciones del bioterio del INR, empleando un equipo semifijo marca General Electric 1000 modelo 46-158800G2. Las placas fueron AFGA ORTHO sensibles al verde de 20 x 40 y fueron tomadas a 10 mA, 45 kV y 4 s a una distancia de 1 metro.

5.3.3.1 Parámetros de infección ósea. Definir los parámetros radiográficos de la infección ósea a seguir durante el proceso infeccioso, que nos servirán de base para la elaboración de una escala radiográfica semicuantitativa.

5.3.3.2 Elaboración de una escala radiográfica semicuantitativa. A partir de los parámetros de infección ósea, elaboramos una escala semicuantitativa proporcionándole un valor a cada parámetro (ligero, moderado y severo o presencia y ausencia) para determinar la intensidad de la infección ósea.

5.3.4 Estudio microbiológico de diversos tejidos de las ratas infectadas.

5.3.4.1 Toma de muestras y sacrificio. Se pesaron a las ratas y se anestesiaron por medio de una mezcla de xilazina (13 mg/kg pc) y ketamina (87 mg/kg pc) por vía intramuscular. Cada rata se revisó de cabeza a cola para determinar su estado de salud general con especial atención a piel y extremidades para determinar la presencia de abscesos. En condiciones estériles se practicó una incisión longitudinal por la línea media desde la segunda costilla hasta el borde inferior del abdomen. Se revisaron los órganos y se tomaron muestras de aproximadamente 5 mm³ de pulmón, hígado y bazo y un 1 mL de sangre del corazón. El sacrificio se realizó por exanguinación tomando 6 mL de sangre con una jeringa directamente del corazón. Se tomaron muestras de abscesos y lesiones de las extremidades infectadas (en caso de haberlos) con la punta de una aguja estéril desechable. Se disecaron las tibias y de las infectadas se tomaron muestras de la superficie de la tibia (región proximal a la articulación) con una aguja (20G y 1/4", DB PrecisionGlide) y del canal medular se tomó una muestra del contenido introduciendo una aguja. Colocamos las muestras en tubos Eppendorf de 1.5 mL con 1 mL de PBS y las transportamos al laboratorio.

5.3.4.2 Cultivo de las muestras de tejidos de animales infectados en diferentes medios. En el laboratorio, bajo condiciones de esterilidad, se procesaron las muestras. Las muestras de pulmón, hígado y bazo se cortaron en

porciones lo más pequeñas posible con un bisturí estéril, los tubos con las muestras de sangre y abscesos en PBS se resuspendieron antes de sembrarlas. Se tomó una asada de muestra de tejido y se sembró por estría en los diferentes medios (agar-sangre, agar-sal y manitol y para algunas muestras en agar-eosina azul de metileno o BBL CHROM-agar) y se incubaron a 37°C por 24 h.

5.3.4.3 Confirmación de la identidad de la cepa inoculada por técnicas bioquímicas. Las muestras que crecieron en los medios de agar-sangre, agar-sal y manitol y BBL CHROM-agar les realizamos diferentes pruebas bioquímicas para confirmar la identidad de la cepa (ver sección de caracterización bioquímica e identificación).

5.4 Tratamiento con leptina (experimento II)

5.4.1 Aplicación de leptina.

5.4.1.1 Animales. Se emplearon un total de 12 ratas: 2 fueron inoculadas con agar-agar al 0,4% y 10 ratas recibieron un inóculo bacteriano de 1×10^6 UFC de *S. aureus* 76 IQM. A 5 de las ratas inoculadas con bacteria se les administró leptina por 30 días.

El mantenimiento y seguimiento de los animales infectados fue como se describe en el experimento I.

5.4.1.2 Administración de leptina. Se administró leptina recombinante de rata (l-rr) (BioVision) con una jeringa para insulina (U100 de 0.5 mL con aguja 31G x 8 mm; BD ultra-fina III) en una dosis de 8 µg/día/30 días en 60 µL de agua inyectable (Pisa) a partir del día de la inoculación (Franco-Bourland y Vergara-Fernández, 2003). Para la aplicación de leptina se colocaron a las ratas en un campo quirúrgico y se inmovilizaron tapándoles la cabeza y enredando el campo sobre su cuerpo suavemente. Un método alternativo para tranquilizarlas es administrar en el agua de beber clonazepam (0.5 mg en 500 mL de agua) media hora antes de su manipulación experimental.

5.4.1.2.1 Seguimiento clínico, análisis macroscópico, estudio radiográfico, análisis microbiológico y confirmación de la identidad: todos estos procedimientos fueron realizados como se describe en el experimento I. En el seguimiento además usamos CHROM-agar.

5.4.1.2.2 Análisis tomográfico. Se realizaron tomografías en las tibias disecadas (solo experimento II) en el Servicio de Tomografía Computarizada del INR (Médico Radiólogo Jefe de Servicio: Dra. Elisa Martínez Coria y Técnico: Martín Luna Méndez), con el tomógrafo Light Speed VTC General Electric. Los parámetros fueron 120 kV, 100 mA, cortes de 0.625 mm y la reconstrucción se realizó con el software del tomógrafo con los parámetros: Recan 1 Bone, Show Recon3 Std. Al realizar la reconstrucción se calculó el volumen para cada una de las tibias.

5.4.1.2.3 Estudio histológico. Las tibias descalcificadas fueron procesadas en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia del Departamento de Patología UNAM.

Las tibias disecadas se fijaron en una solución de formol al 10%. Se descalcificaron empleando ácido nítrico al 6%; el ácido nítrico se cambió cada tercer día durante 3 a 4 semanas hasta su completa descalcificación (doblamiento fácil de la tibia). Una vez descalcificadas fueron cortadas de forma transversal y longitudinal (Figura 9 A). Los cortes de las tibias se acomodaron dentro de cápsulas para su procesamiento histológico (Figura 9 B y C). Para quitar los residuos de ácido se colocaron en recipiente con agua destilada por 24 h, pasado este tiempo se colocaron en el

procesador de tejidos para histología Histoquinette donde los cortes de las tibias fueron deshidratadas en alcoholes de diferentes concentraciones a partir de 70% a absoluto (100%) de alcohol en fracciones crecientes de 10% y se aclaran con xileno (Figura 9 D). Posteriormente, los especímenes se infiltran e incluyeron en parafina. El bloque de parafina se colocó en una plancha de enfriamiento por 2 h; pasado este tiempo se llevó a un congelador por 24 h para su endurecimiento. Los bloques luego se montaron en un microtomo, se cortaron en secciones de 4 μm (Figura 9 E) y se montaron sobre portaobjetos de vidrio. Para teñirlos, los portaobjetos se situaron sobre una plancha tibia para retirar la parafina; luego se pasaron por xileno y se rehidrataron con concentraciones decrecientes de alcohol (100-70%) en fracciones de 10% y se tiñeron con hematoxilina/eosina (HE) (Figura 9 F). Finalmente se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol (70 a 100%) en fracciones de 10%, se pasaron por xileno y se colocó un cubreobjetos sobre los cortes de tejido teñido para preservarlos.

En los cortes histológicos valoramos la presencia de abscesos, secuestros, reacción perióstica (involucro), adelgazamiento de las corticales, fractura de corticales e impresión general, por medio de un microscopio (Nikon eclipse 80i) con los diferentes objetivos y se tomaron las fotos con una cámara digital (Nikon DS-SM).

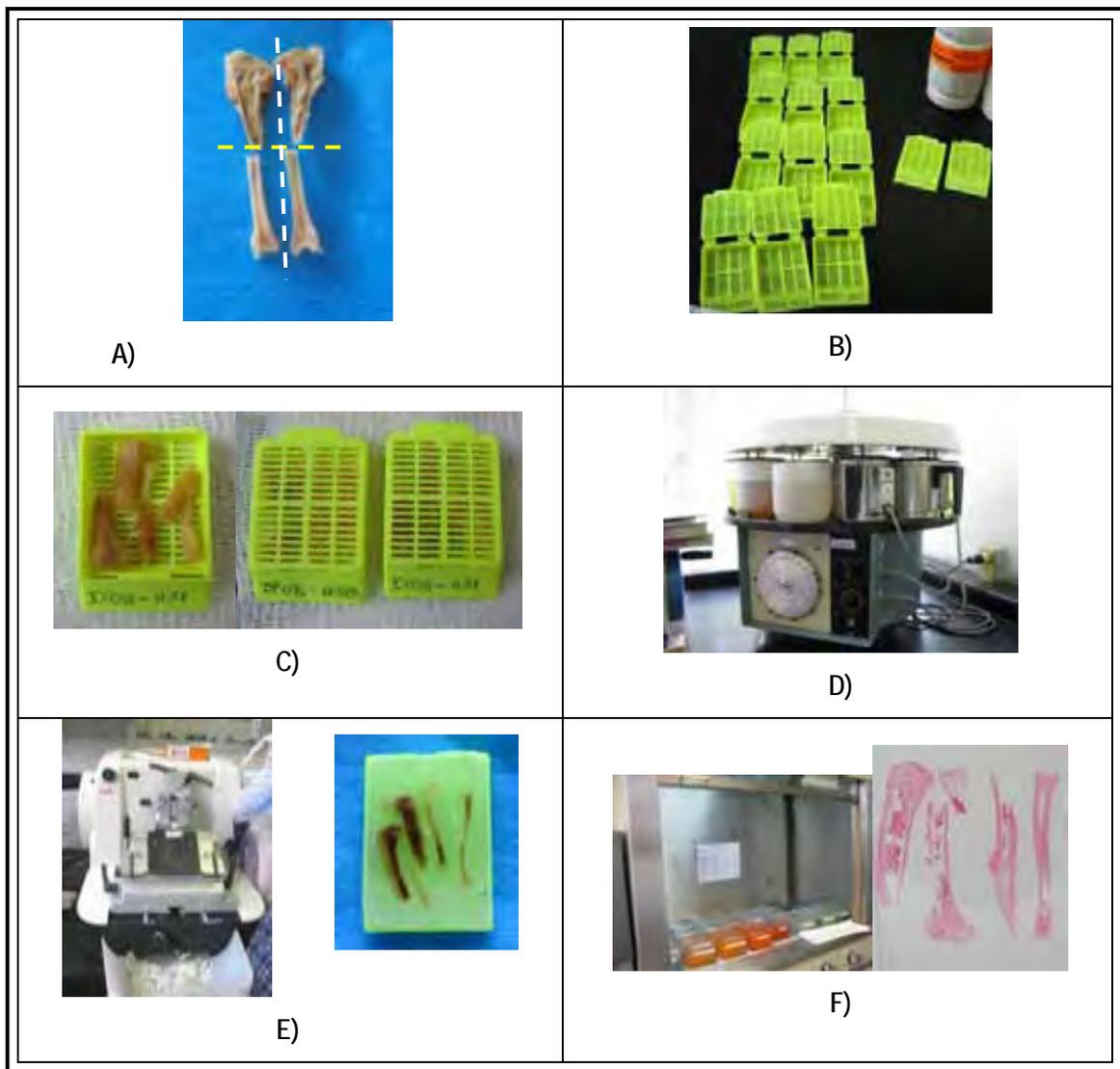


Figura 9. Procesamiento de las tibias descalcificadas para histología. A) Cortes transversal y longitudinal de una tibia descalcificada; B) cápsulas en donde se colocaron las tibias; C) cortes de tibia dentro de las cápsulas para su procesamiento histológico; D) histoquinette donde se deshidrataron los cortes en concentraciones crecientes de alcohol; E) microtomo en donde se realizaron los cortes de $4\ \mu\text{m}$ de los bloques de parafina y bloque de parafina con cortes de tibia y F) soluciones para la tinción y corte de tibia teñido con HE.

VI RESULTADOS

6.1 Osteomielitis en tibia de rata: inoculación con concentraciones decrecientes de *S. aureus* 76 IQM (experimento I)

6.1.1 Inoculación de la bacteriana en el canal medular.

6.1.1.1 Verificación de la colocación del clavo dentro del canal medular. Radiográficamente se verificó la colocación del clavo dentro del canal medular. En la Figura 10 A se ilustra una colocación correcta y en la Figura 10 B la colocación resultó fuera del canal medular.

6.1.1.2 Verificación del procedimiento de inoculación en el canal medular con sulfato de bario (Ba_2SO_4). La Figura 11 A ilustra la colocación correcta del Ba_2SO_4 en el canal medular. En la Figura 11 B el Ba_2SO_4 está fuera del canal medular.

6.1.1.3 Inoculación de la cepa 76 IQM de *S. aureus*. Se realizó la inoculación dentro del canal medular de la tibia izquierda de ratas con una mezcla de 10 μ L de agar-agar al 0.4% y concentraciones decrecientes de *S. aureus* 39, 19, 9, 4, 2 a 1×10^6 UFC.

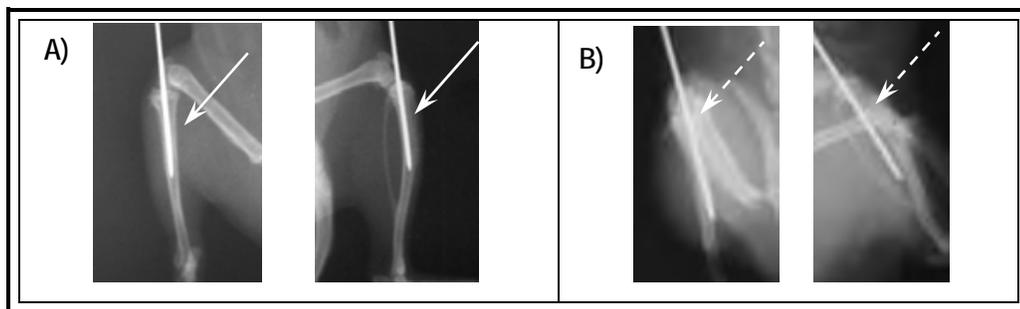


Figura 10. Estudios radiográficos de la colocación del clavo dentro del canal medular de la tibia. A) Estudio cráneo-caudal y medio-lateral de tibia de rata, las flechas indican el clavo dentro del canal medular y B) estudio cráneo-caudal y medio-lateral de tibia de rata, las flechas discontinuas indican la colocación del clavo fuera del canal medular.

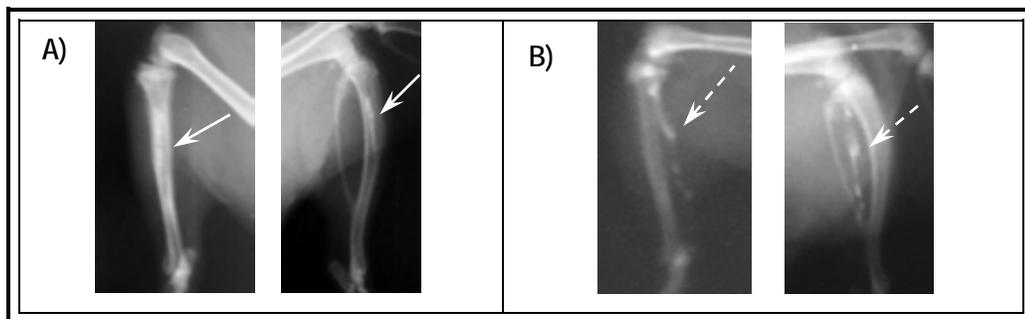


Figura 11. Estudios radiográficos de la colocación del Ba_2SO_4 en el canal medular. A) Estudio cráneo-caudal y medio lateral de tibia de rata, las flechas señalan la tibia con el Ba_2SO_4 dentro del canal medular y B) estudio cráneo-caudal y medio-lateral de tibia de rata, las flechas discontinuas muestran el Ba_2SO_4 fuera del canal medular.

6.1.2 Seguimiento clínico.

Después de la inoculación las ratas fueron colocadas en jaulas individuales. Los primeros 3 días se veían decaídas, inmóviles, con el pelo erizado y perdieron peso corporal (Figura 12 A, B y C). Se observó la extremidad infectada inflamada y se sintió caliente, aunque el registro de la temperatura rectal de la rata nunca varió. Aproximadamente a partir de los 4 días posinoculación, las ratas comenzaron a recuperarse.

Las ratas se recuperaron del procedimiento a los 8 días de inoculación y a partir de los 15 días comenzaron a subir de peso. Recuperaron primero su peso corporal y a los 30 días pesaron más que al inicio del experimento (Tabla 2) mostrando un buen estado de salud excepto por la marcha alterada de la extremidad infectada.

Todas las ratas presentaron formación de uno o varios abscesos de diversos tamaños en la extremidad infectada, cuyo tamaño no varió mucho durante los 30 días del experimento. Algunos abscesos mostraron secreción de material purulento (Figura 12 D, E y F). Las ratas control no mostraron ninguna alteración en su estado de salud ni función motora.

Tabla 2. Peso corporal durante los 30 días del experimento.

Manejo experimental	Peso corporal, g Día de la inoculación	Peso corporal, g 15 d posinoculación	Peso corporal, g 30 d posinoculación
Control	344	383	439
Control	398	452	492
Control	377	445	483
Control	340	426	488
Control	337	380	449
Control (Media \pm error estándar)	359.2 \pm 12.07	417.2 \pm 15.19	470.2 \pm 10.91
39X10 ⁶ UFC ^a	382	335	450
39X10 ⁶ UFC	404	395	458
19X10 ⁶ UFC	375	359	407
9 X10 ⁶ UFC	410	393	475
4x10 ⁶ UFC	329	268	349
4x10 ⁶ UFC	327	318	380
2x10 ⁶ UFC	373	381	460
2x10 ⁶ UFC	349	335	397
1x10 ⁶ UFC	353	328	390
1x10 ⁶ UFC	385	369	456

^a UFC, unidades formadoras de colonias *S. aureus*

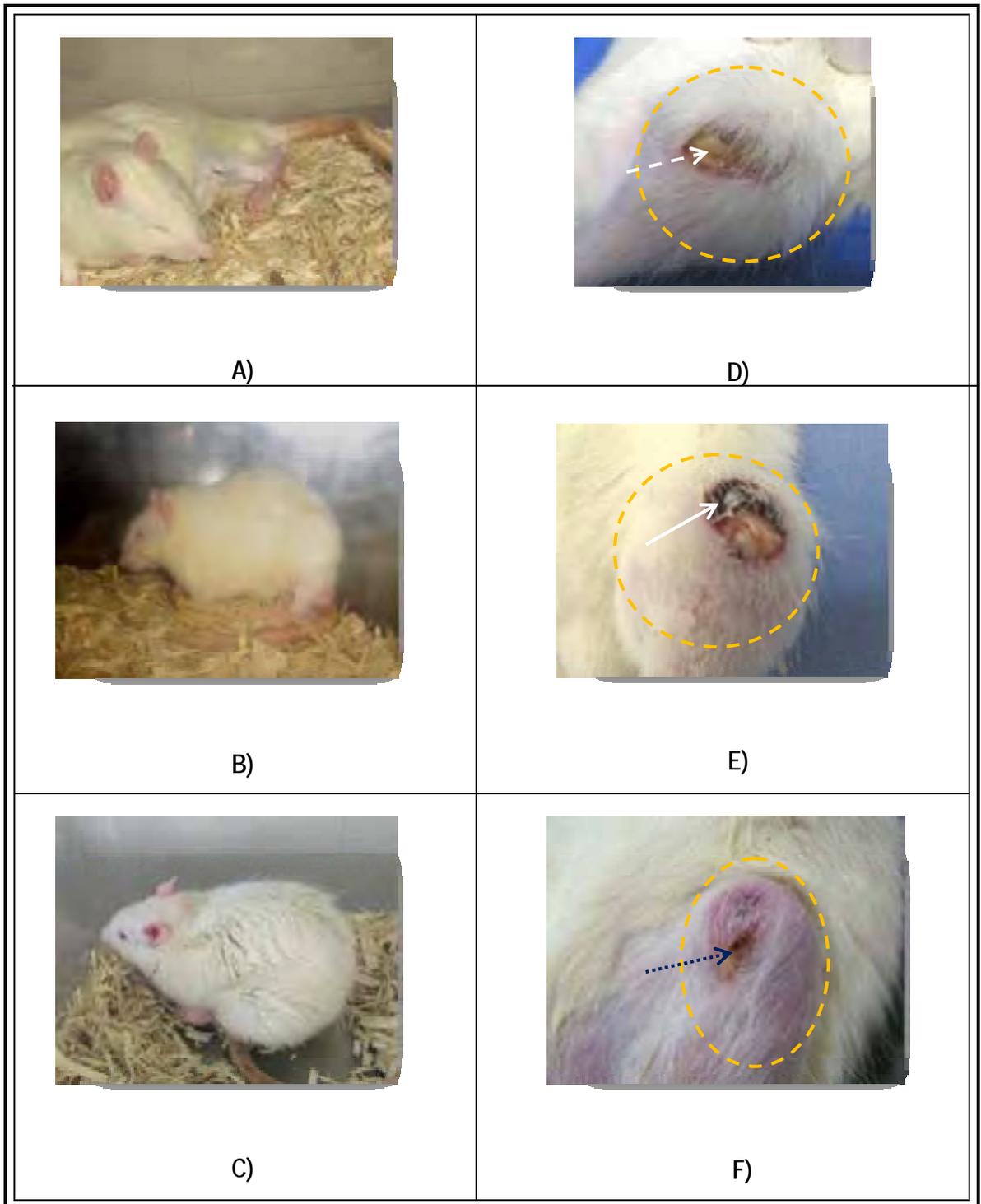


Figura 12. Rata infectada y abscesos en miembros inoculados. A) Decaída; B) inmóvil; C) con el pelo erizado; D) absceso con material purulento (- ➔); E) material purulento en absceso rodeado por tejido necrótico (➔) y F) lesión y fístula (..... ➔).

6.1.3 Análisis macroscópico.

Las tibias disecadas de la extremidad infectada mostraron: engrosamiento por formación del involucro, deformación ósea y perforación del involucro (Figura 13).

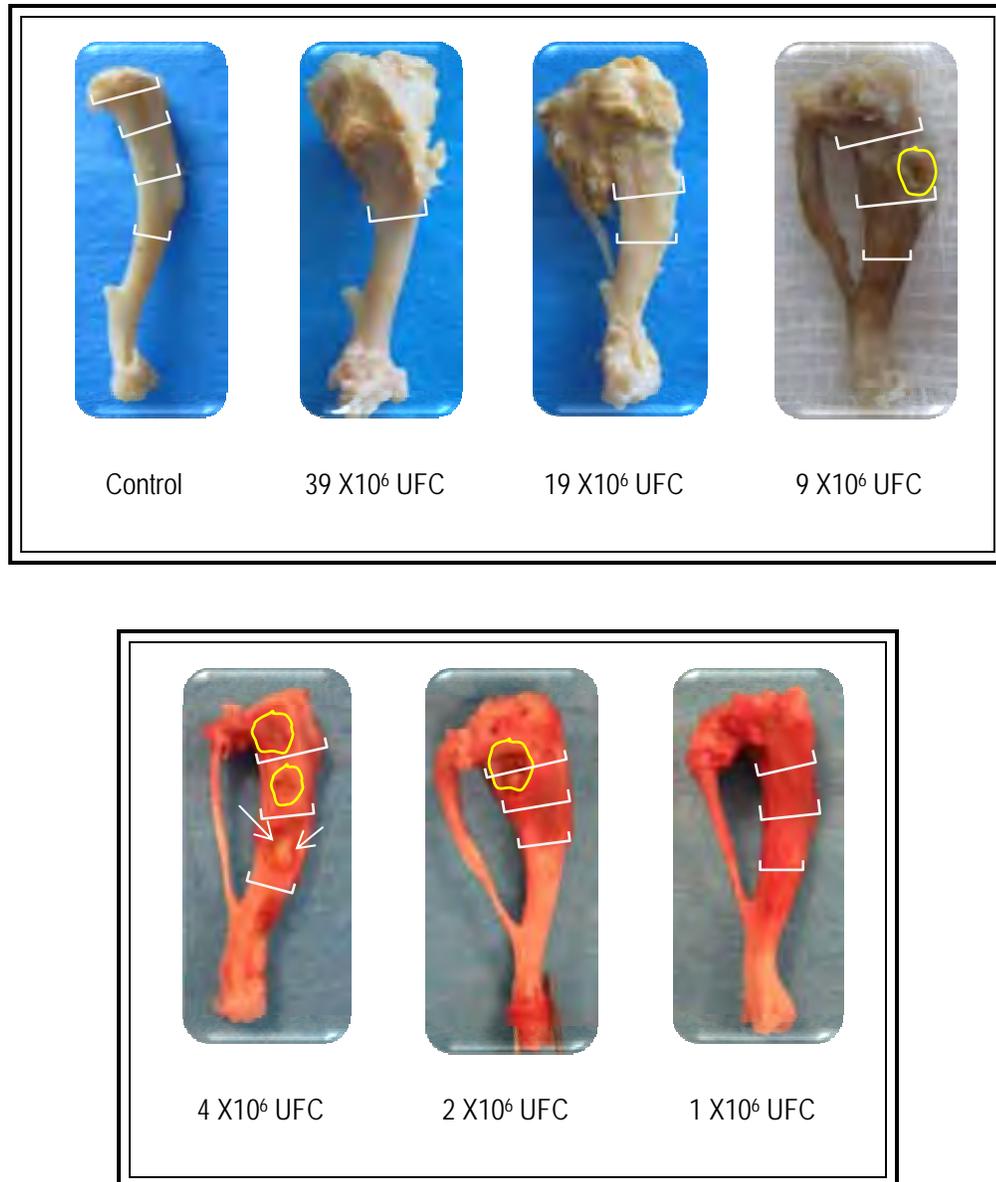


Figura 13. Tibias disecadas de las ratas inoculadas con las diferentes concentraciones de *S. aureus* probadas. Se observan el engrosamiento óseo (┌), perforación del involucro (○) deformación ósea, se asoma la cortical (↙).

6.1.4 Estudio radiográfico.

Todas las tibias inoculadas con *S. aureus* de 39 a 1×10^6 UFC mostraron las características radiográficas propias de un hueso con osteomielitis: engrosamiento del hueso tibial por el involucro debido a la reacción perióstica; deformación de la tibia; abscesos; osteoesclerosis; adelgazamiento de las corticales; formación de sequestros (fragmentos de las corticales), fractura y reacción endóstica (Figura 14). Las tibias inoculadas con agar-agar 0.4% no presentaron datos de infección.

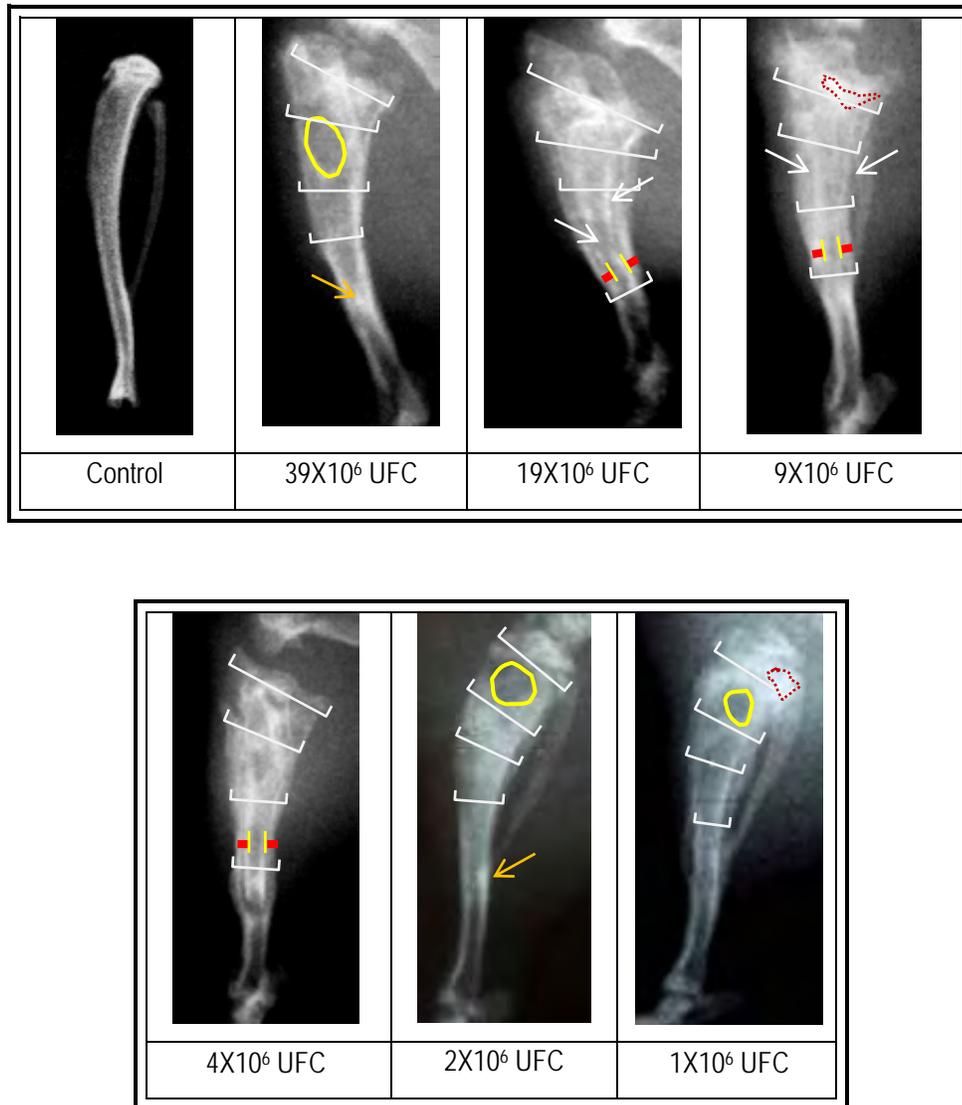


Figura 14. Estudio radiográfico de tibias inoculadas con concentraciones variables de *S. aureus* 76 IQM.

Engrosamiento del hueso tibial (—) por el involucro (—) debido a la reacción perióstica, también se aprecia el adelgazamiento de las corticales (||); osteoesclerosis (- - -); abscesos (○); reacción endóstica (↙) y deformación.

6.1.4.1 Parámetros de infección ósea. Para determinar el desarrollo de la infección ósea se evaluó la intensidad de la infección a lo largo de toda la tibia inoculada, considerando diferentes parámetros de infección ósea (Figura 15) y sus grados de intensidad (Figura 16).

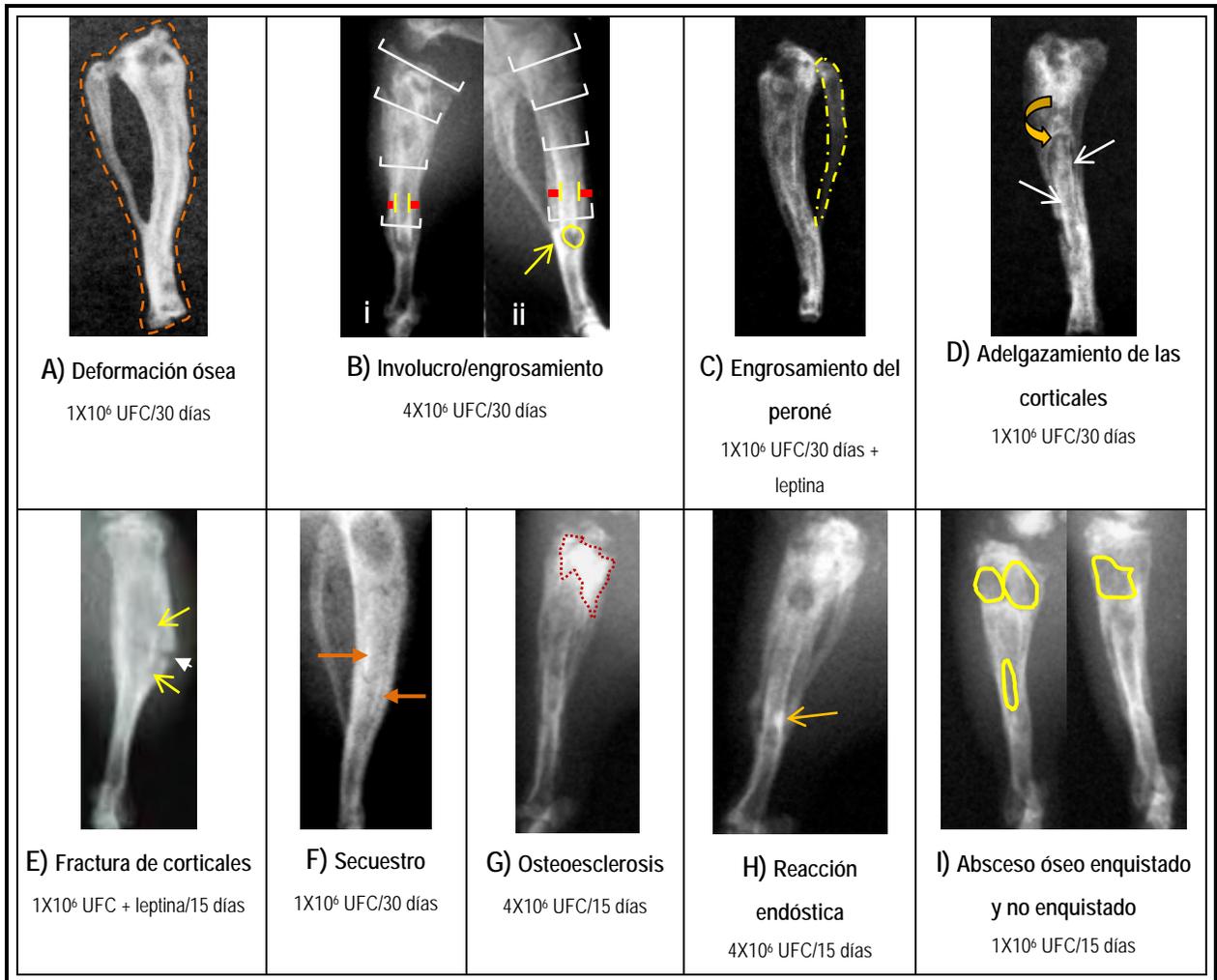
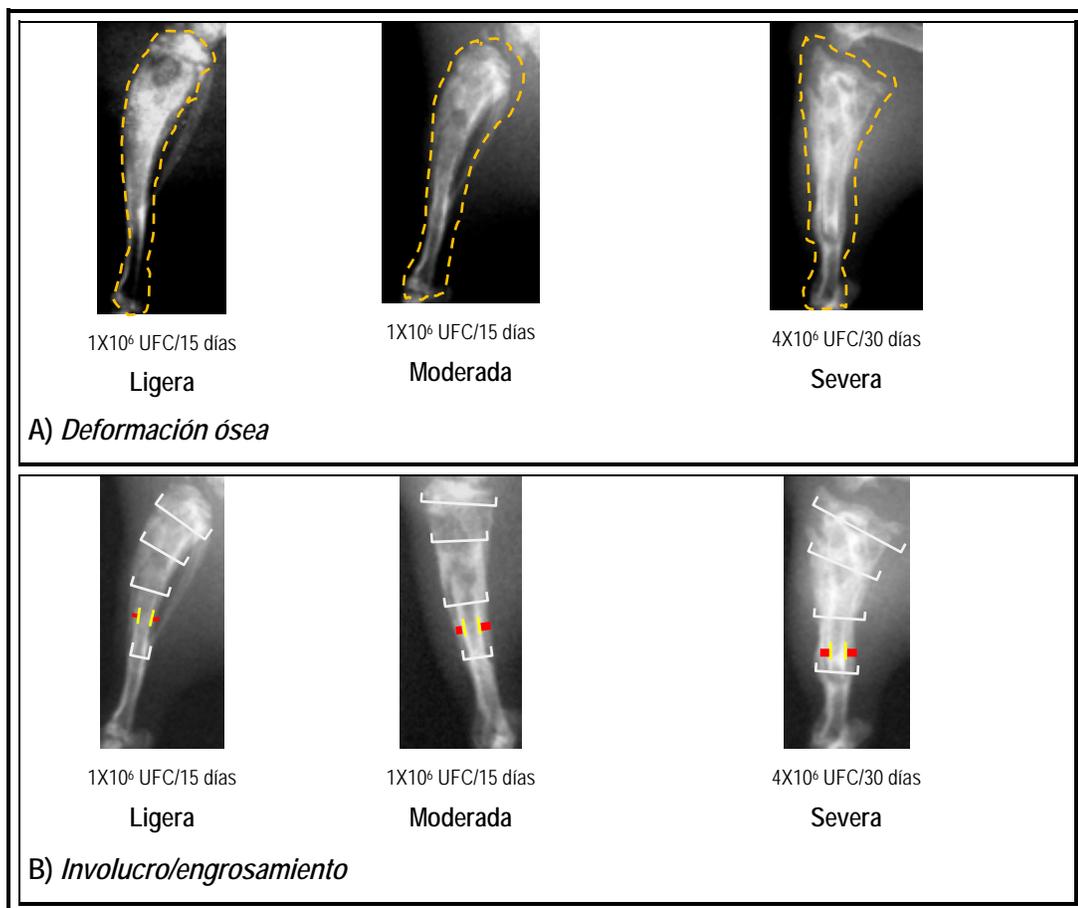


Figura 15. Parámetros de infección ósea a evaluar en tibias inoculadas con *S. aureus* 76 IQM. **A)** Radiografía medio-lateral: la línea punteada resalta la deformación ósea de la tibia infectada; **B)** radiografías craneo-caudal (i) y medio-lateral (ii): se señala el engrosamiento del hueso tibial (—) por el involucro (—) debido a la reacción perióstica, el adelgazamiento de las corticales (| |) y un absceso (○); **C)** radiografía medio-lateral: se muestra el engrosamiento del peroné (—); **D)** radiografía medio-lateral: las flechas muestran el adelgazamiento de las corticales y perforación del involucro (↻); **E)** radiografía craneo-caudal, las flechas señalan una fractura en la cortical y la cabeza de flecha indica la fractura en el involucro; **F)** secuestro (fragmentos de hueso) (←); **G)** radiografía craneo-caudal: se señala zona de osteoesclerosis (—); **H)** radiografía craneo-caudal: la flecha señala la reacción endóstica (←) e **I)** radiografía medio-lateral: Absceso óseo enquistado (○) y no enquistado (—); En A, C y D: son radiografías de la extremidad infectada de la tibia disecada y en B, E, F, G, H e I: son radiografías de la extremidad infectada en la rata viva.

6.1.4.2 Elaboración de una escala radiográfica semicuantitativa para evaluar la intensidad de la infección ósea. Basándonos en el trabajo de Rissing (Rissing et al; 1985) evaluamos los siguientes parámetros: deformación ósea; involucro/engrosamiento del hueso tibial debido a la reacción perióstica; engrosamiento del peroné; osteoesclerosis y abscesos enquistados y no enquistados (Figura 15 A, B, C, G e I). La intensidad de los parámetros se evaluó de la siguiente manera: 0 (ausencia), 1 (ligero), 2 (moderado) y 3 (severo) [Figura 16 A, B, C y D]. Para los abscesos enquistados y no enquistados los evaluamos en función a su tamaño y multiplicidad: 1 (pequeño), 2 (grande) y 3 (múltiple) [Figura 16 E] y para el adelgazamiento de las corticales: 1 (adelgazamiento), 2 (fractura) y 3 (destrucción) [Figura 15 D].

Además se evaluó la fractura de corticales, formación de secuestros (fragmentos de hueso), y reacción endóstica simplemente como: 0 (ausencia) y 1 (presencia) [Figura 15 E, F y H]. La suma total de los puntos para cada parámetro constituyó una medida semicuantitativa de la intensidad de la infección.

6.1.4.2.1 Escala radiográfica semicuantitativa.



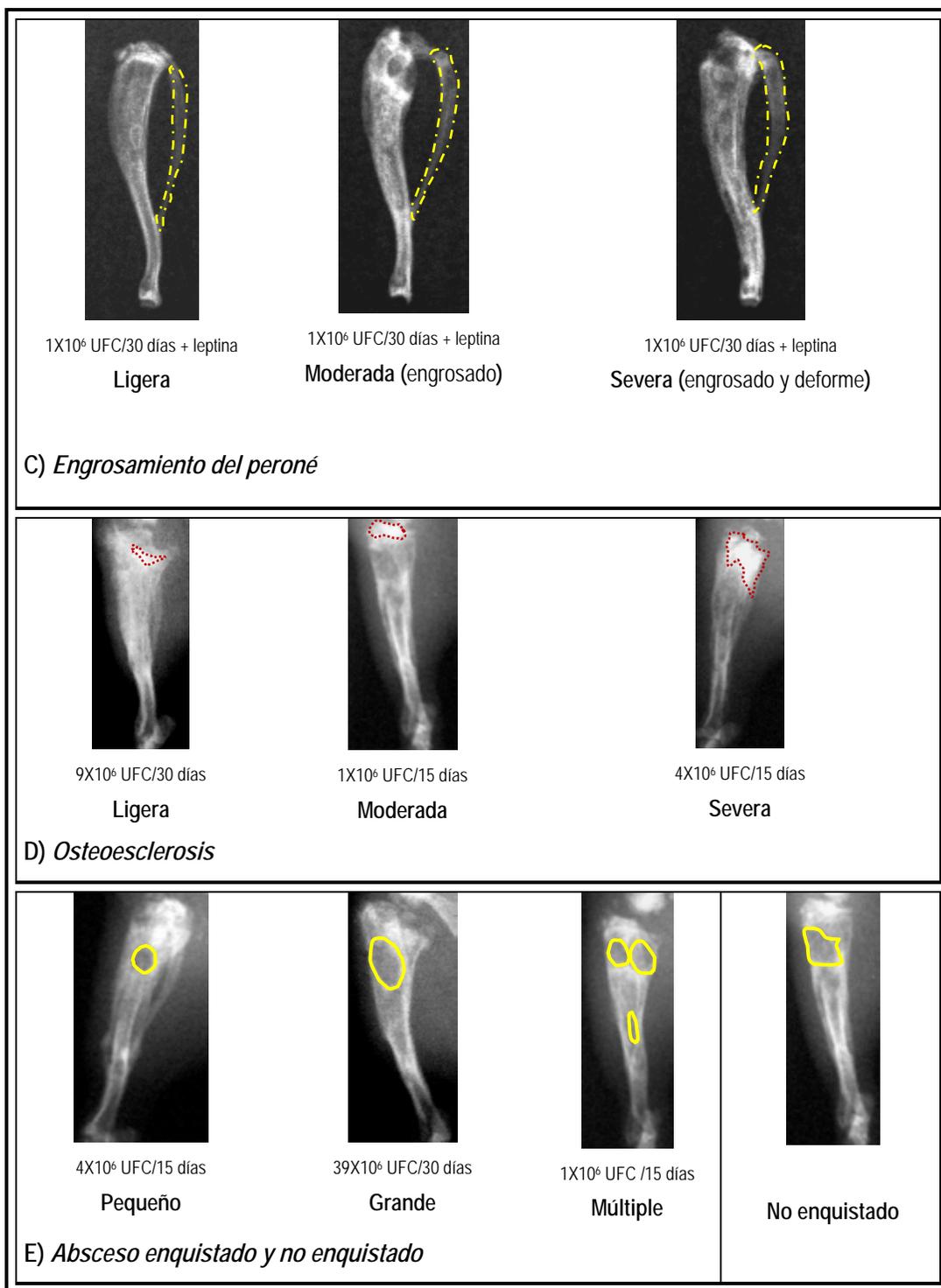


Figura 16. Grado de intensidad de los parámetros de infección ósea a evaluar en extremidades infectadas con *S. aureus* 76 IQM. En cada grupo de imágenes en A, B, C y D se ilustran la intensidad de los parámetros (ligera, moderada y severa) para valorar la infección ósea tibial: **A)** Deformación ósea; **B)** involucro/engrosamiento del hueso tibial, debido a la reacción perióstica, también se aprecia el adelgazamiento de las corticales; **C)** engrosamiento del peroné; **D)** osteoesclerosis y **E)** abscesos enquistados (pequeño, grande y múltiple) y no enquistados.

6.1.5 Estudio microbiológico de diversos tejidos de las ratas infectadas.

Muestras tomadas de tejidos (pulmón, bazo, hígado y sangre), abscesos y canal tibial (Figura 17) fueron sembradas por estría en agar-sangre, agar-sal y manitol y agar-eosina azul de metileno. Se incubaron a 37°C por 24 h. Los resultados de los cultivos se muestran en la Figura 18. Para las muestras de tejidos sembradas en agar-sangre, agar-sal y manitol y agar-eosina azul de metileno fueron negativas, lo que demostró que la bacteria no se propagó por el organismo de la rata.

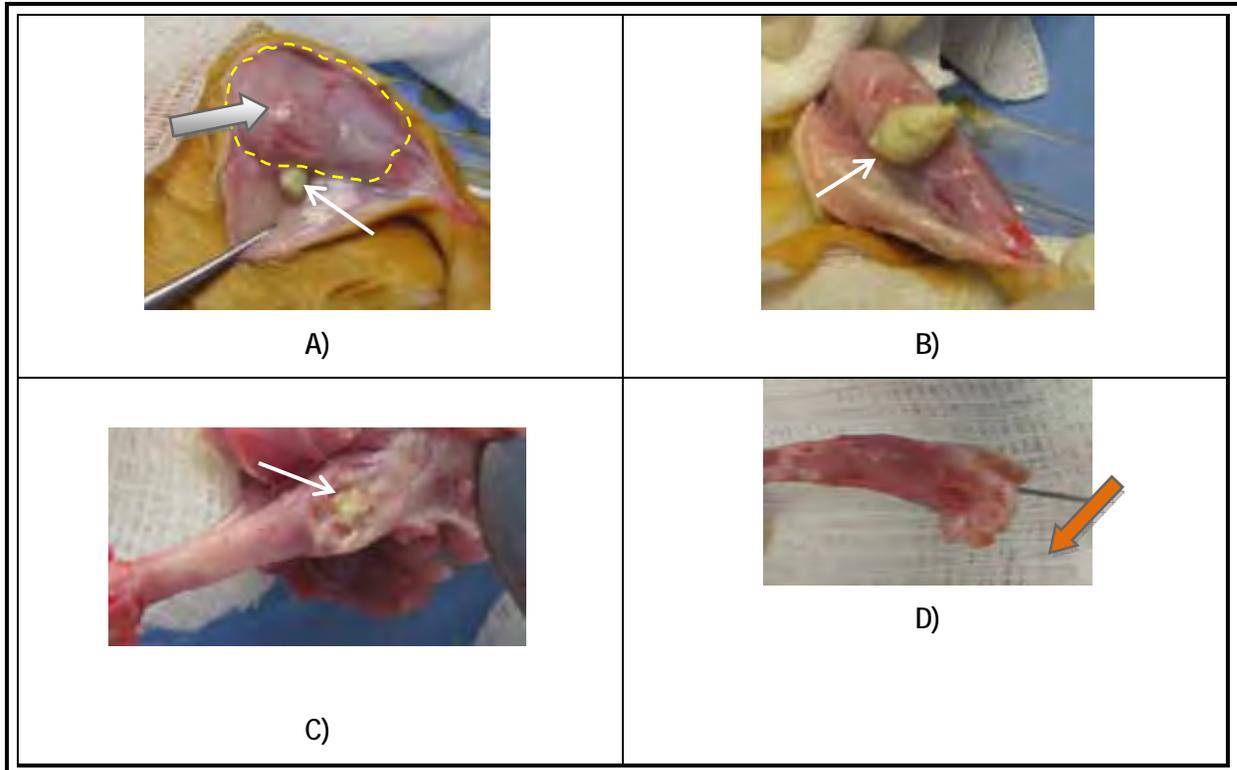


Figura 17. Toma de muestras de abscesos y de canal medular. Se separó la piel de la extremidad infectada descubriendo un absceso (A); después de perforar el tejido fibroso, salió el contenido de material purulento (B) (material pastoso y granuloso) que se muestreó. También se tomó muestra del material purulento de la base del absceso (C) comunicado con el canal medular en A y B. En D se ilustra la toma de muestra del canal medular mediante una aguja (D).

Para las muestras de abscesos y canal medular, las pruebas fueron positivas en agar-sangre y en agar-sal y manitol no así en agar-eosina azul de metileno (donde no crece *S. aureus*). Los cultivos en agar-sangre y en agar-sal y manitol cumplen con las características de *S. aureus* (Figura 18).

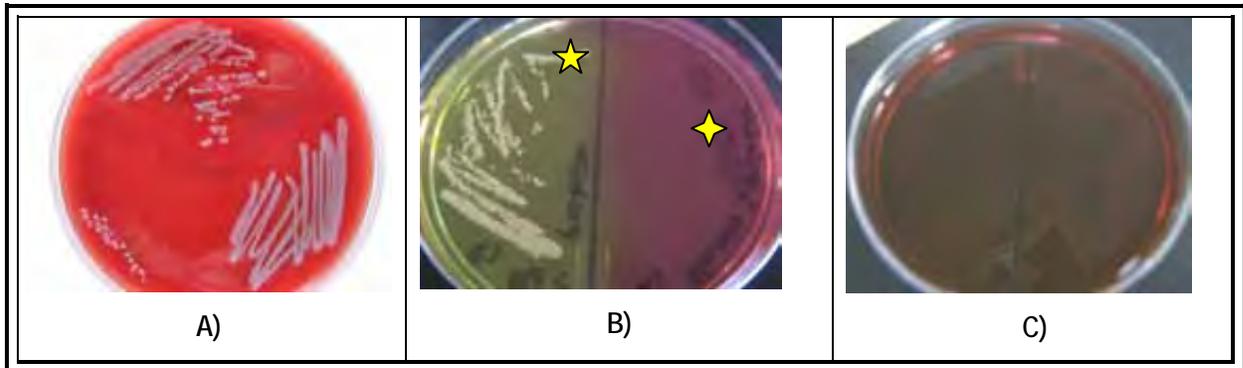


Figura 18. Resultados de los cultivos de muestras de tejido. A) Cultivo positivo en agar-sangre; B) cultivo positivo (★) y negativo (★/) en agar-sal y manitol y C) cultivo negativo en agar-eosina azul de metileno.

6.1.5.1 Confirmación de la identidad de la cepa inoculada por técnicas bioquímicas. Se confirmó la identidad de la cepa 76 IQM de *S. aureus* aislada de tejidos como se describe en material y métodos.

6.2 Conclusiones experimento I

Reprodujimos un modelo de osteomielitis estafilocócica basado en uno que previamente se generó en el laboratorio (Hernández-Arellano, 2005). La infección que se produjo por inoculación de *S. aureus* 76 IQM con las diferentes concentraciones de bacteria en el canal medular de ratas Wistar fue intensa, aunque controlada. Los animales inoculados con cantidades mayores de bacteria tardaron proporcionalmente más tiempo en recuperarse pero en ningún caso murieron por sepsis. La bacteria se mantuvo contenida dentro de la extremidad inoculada, una condición fundamental para que el nuestro sea un modelo de experimentación útil.

A partir de radiografías de tibias con osteomielitis determinamos los parámetros de infección y desarrollamos una escala semicuantitativa para valorar la intensidad de la infección.

Los animales que recibieron 1×10^6 UFC, se recuperaron del procedimiento en menor tiempo que con concentraciones mayores de bacteria, lucieron sanos durante el mes de experimentación a excepción de la extremidad infectada y muestran las características de osteomielitis, por lo que decidimos utilizar esta concentración para determinar el efecto de la leptina en nuestro siguiente experimento.

6.3 Tratamiento con leptina de tibias de rata infectadas con *S. aureus* 76 IQM (experimento II)

6.3.1 Inoculación bacteriana.

Diez ratas fueron infectadas con un inóculo bacteriano de 1×10^6 UFC y a 5 se les administró leptina $8 \mu\text{g}/\text{día}/30$ días a partir del día de la inoculación.

6.3.2 Seguimiento clínico.

Los primeros días 3 días posteriores a la inoculación tanto las ratas no tratadas como las tratadas que recibieron leptina estaban decaídas, adoloridas del miembro infectado, algunas se encontraban inflamadas, claudicaban y no apoyaban la extremidad infectada que se sentía caliente A los 8 días posinoculación, todas las ratas se habían recuperado del procedimiento quirúrgico. A los 15 días todas recuperaron el peso corporal inicial y a los 30 días de la infección todas mostraron un aumento de peso por arriba de su peso inicial (Tabla 3 y Figura 19), mostrando un buen estado de salud con excepción del miembro infectado. Las ratas control (inoculadas con agar-agar al 0.4%) no presentaron ningún signo de infección durante el experimento.

Tabla 3. Peso corporal durante los 30 días del experimento.

Manejo experimental	Peso corporal, g Día de la inoculación	Peso corporal, g 15 d posinoculación	Peso corporal, g 30 d posinoculación
Control	354	400	448
Control	358	423	477
1×10^6 UFC ^a	305	292	385
1×10^6 UFC	328	287	358
1×10^6 UFC	288	301	416
1×10^6 UFC	353	342	355
1×10^6 UFC	318	330	418
1×10^6 UFC + leptina ^b	366	387	473
1×10^6 UFC + leptina	356	350	431
1×10^6 UFC + leptina	377	387	464
1×10^6 UFC + leptina	322	382	422
1×10^6 UFC + leptina	349	385	422

^a UFC, unidades formadoras de colonias de *S. aureus* y ^b dosis de $8 \mu\text{g}/\text{día}/30$ días

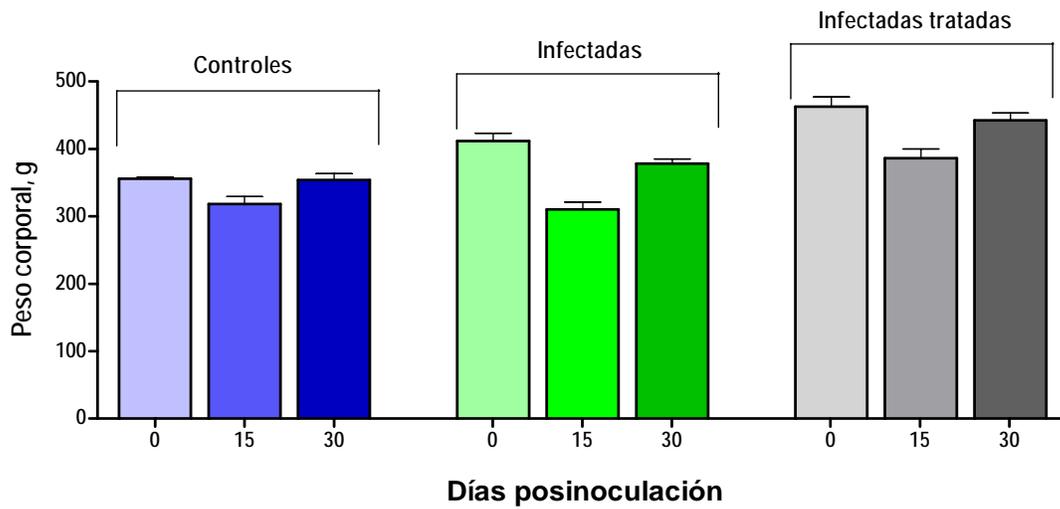


Figura 19. Peso corporal. Las ratas de los 3 grupos experimentales fueron pesadas los días 0, 15 y 30 posinoculación. A los 15 días posinoculación todas las ratas bajaron de peso y a los 30 días se recuperaron. Estos pesos en las ratas infectadas y en las ratas infectadas tratadas demuestran un buen estado de salud.

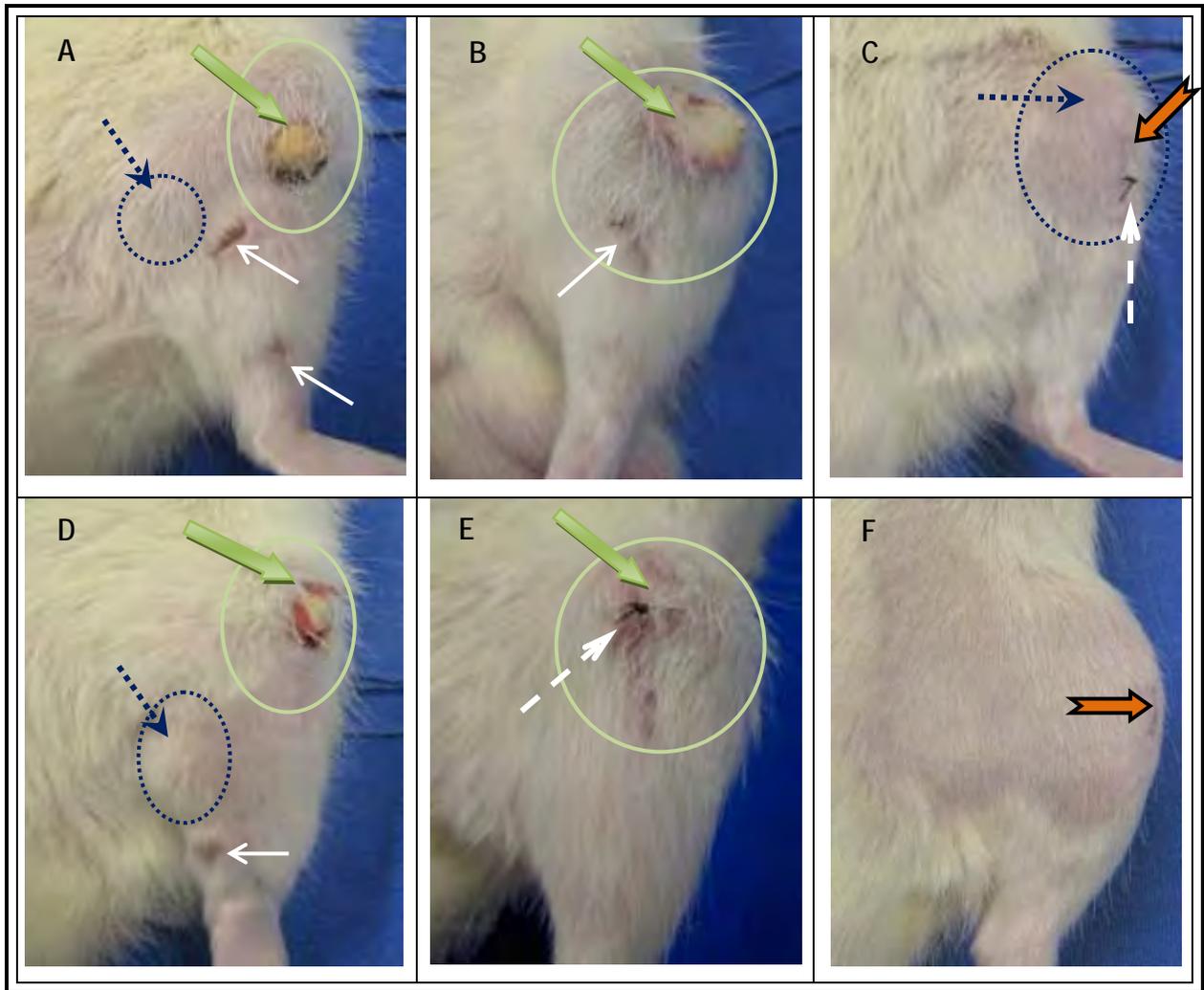


Figura 20. Aproximación clínica de ratas infectadas no tratadas a 15 días posinoculación con 1×10^6 UFC de *S. aureus* en agar-agar al 0.4%. En A, B, D y E se muestran abscesos con supuración de material purulento (); en A, B y D abscesos con lesión (); en A, C y D abscesos bajo la piel (); en C y E se indica la sutura (); en C se indica la cicatriz postquirúrgica () y en F se muestra la extremidad de una rata control inoculada con agar-agar 0.4% sin signos de infección.

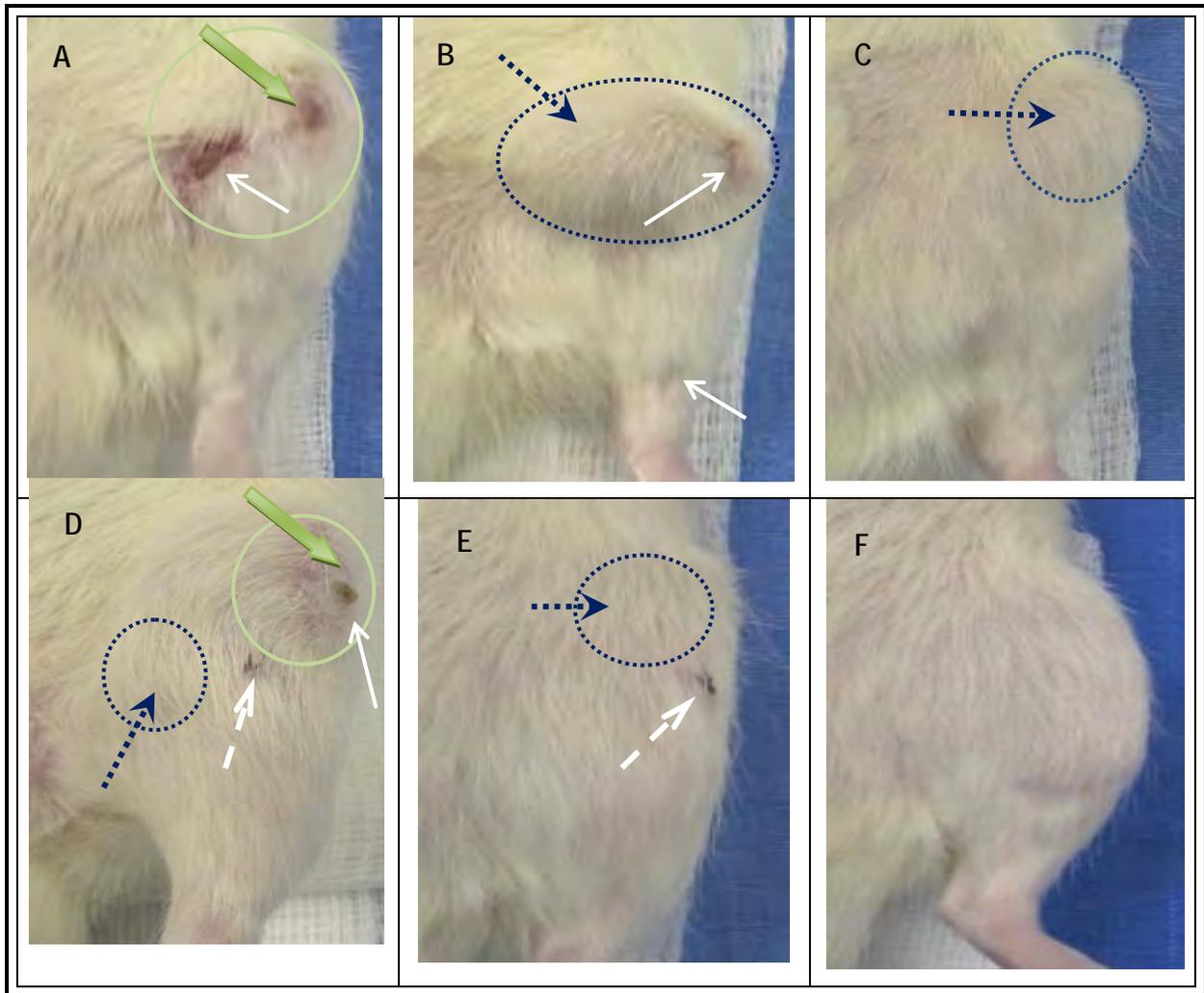


Figura 21. Aproximación clínica de ratas infectadas no tratadas a 30 días posinoculación con 1×10^6 UFC de *S. aureus* en agar-agar al 0.4%. En A y D se muestran abscesos con supuración de material purulento (); en A, B y D abscesos con lesión en (); en B, C, D y E abscesos bajo la piel (); en D y E se indica la sutura () y en F se muestra la extremidad de una rata control inoculada con agar-agar 0.4% sin signos de infección.

6.3.2.1 Ratas infectadas no tratadas. A los 15 días posinoculación todas estas ratas estaban inflamadas de la extremidad infectada, mostrando de uno a tres abscesos de diversos tamaños de ellos algunos con lesiones en la piel, con y sin supuración de material purulento (Figura 20 A, B, C, D y E). En cuanto a su marcha esta se mostró alterada en todas las ratas; la inflamación de la articulación redujo su función, impidiendo que pudieran apoyar su pata completamente resultando en una marcha claudicante. La marcha alterada no es atribuible al procedimiento de inoculación, ya que las ratas control no infectadas presentan una marcha normal.

A los 30 días posinoculación los abscesos tenían mejor aspecto (Figura 21 A, B, C, D y E), la extremidad infectada estaba menos inflamada que a los 15 días posinoculación aunque la marcha continuó alterada.

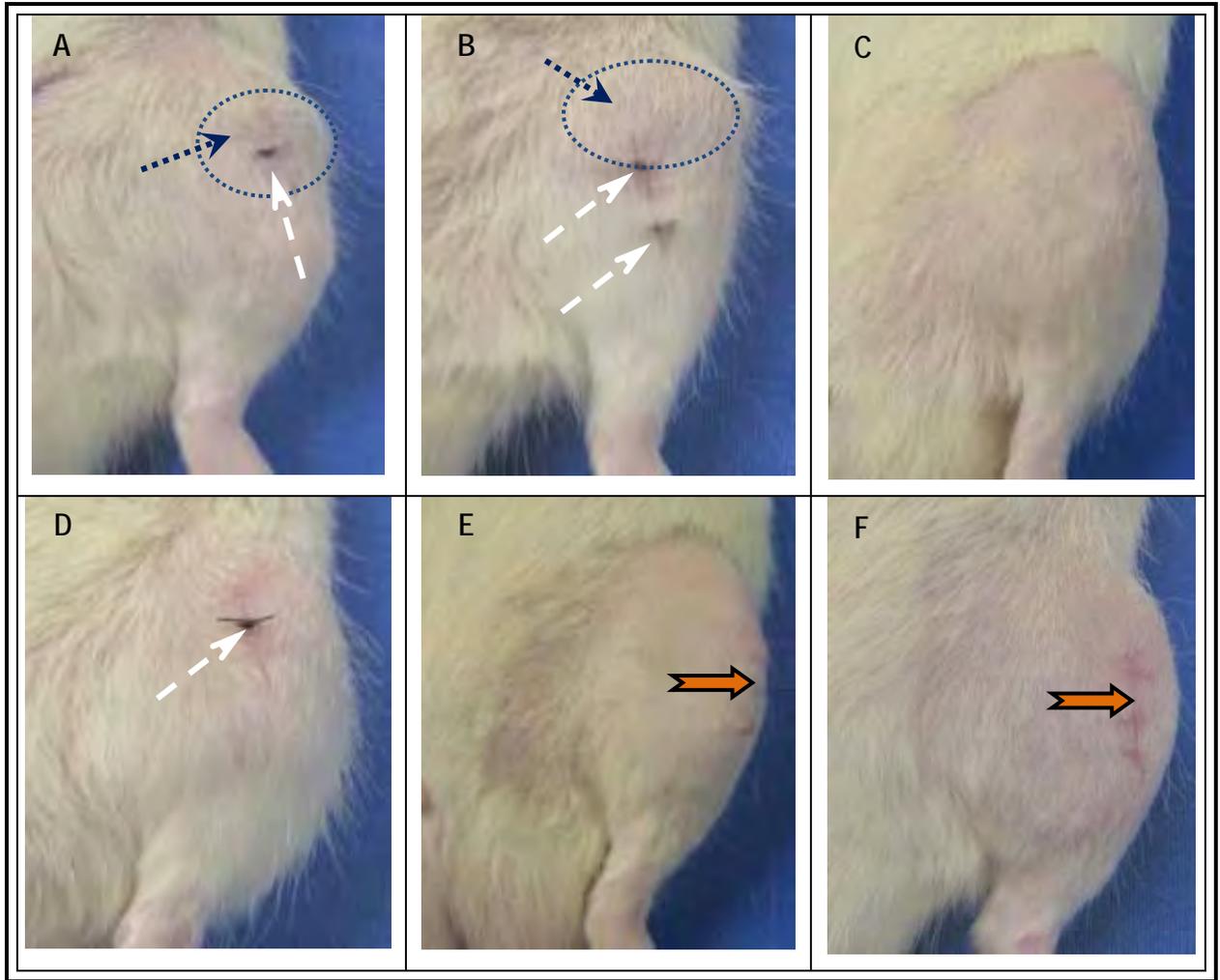


Figura 22. Aproximación clínica de ratas infectadas tratadas a 15 días posinoculación con 1×10^6 UFC de *S. aureus* en agar-agar al 0.4%. En A y B abscesos bajo la piel (); en A, B y D se indica la sutura () en E y F se indica la cicatriz postquirúrgica () y en F se muestra la extremidad de una rata control inoculada con agar-agar 0.4% sin signos de infección.

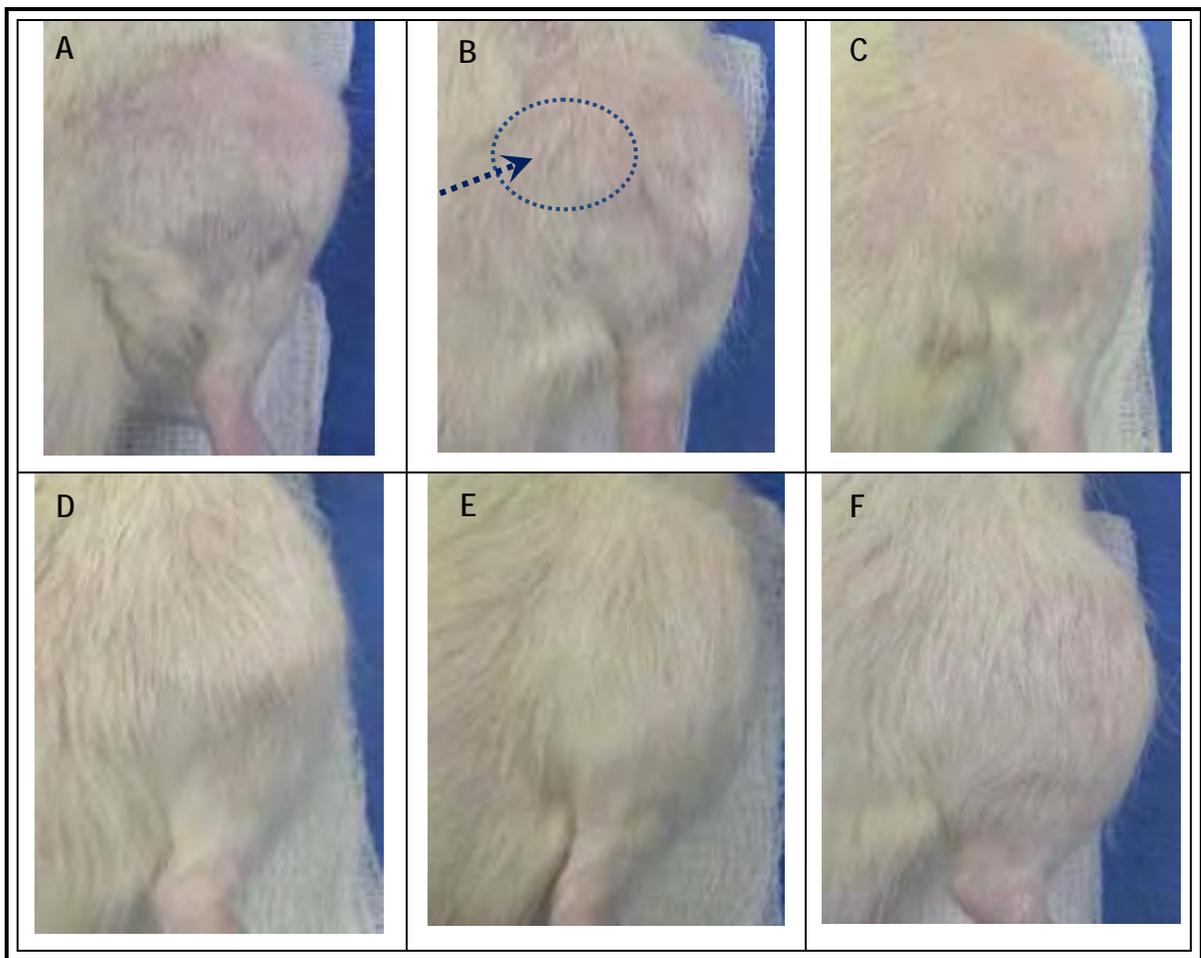


Figura 23. Aproximación clínica de ratas infectadas tratadas a 30 días posinoculación con 1×10^6 UFC de *S. aureus* en agar-agar al 0.4%. En B absceso bajo la piel () encontrado a la hora de la disección y en F se muestra la extremidad de una rata control inoculada con agar-agar 0.4% sin signos de infección.

6.3.2.2 Ratas infectadas tratadas con leptina. A los 15 días posinoculación se observó la formación de abscesos en 2. Estos abscesos no supuraron y fueron de menor tamaño que los de las ratas no tratadas (Figura 22 A, B y C), 4 de las 5 ratas mostraron una marcha alterada aunque no dejaron de apoyar su pata. Solo en tres de ellas se inflamaron las extremidades infectadas. La marcha alterada no es atribuible al procedimiento de inoculación, ya que las ratas control no infectadas presentan una marcha normal.

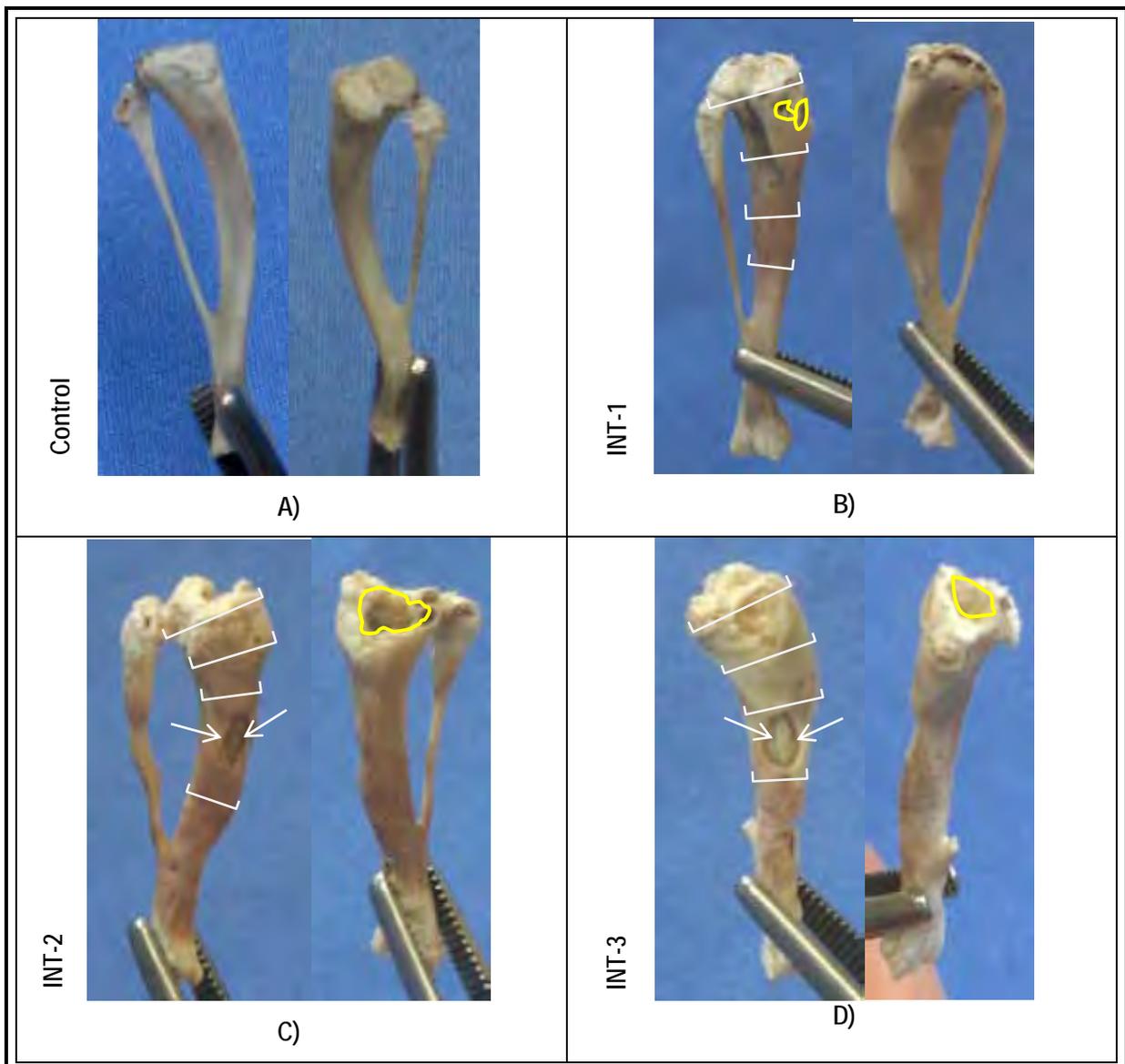
A los 30 días posinoculación y tratados con leptina solo 1 rata mostró un absceso que se hizo evidente solo al disecar la tibia (Figura 23 B). En cuanto a la marcha: 2 de las cuatro ratas con marcha alterada recuperan su marcha normal. A lo largo de los 30 días del experimento las ratas control (Figura 21 D y 22 D) se mantuvieron sanas.

La intensidad (marcha/abscesos) de las manifestaciones clínicas de las extremidades infectadas con *S. aureus* de las ratas tratadas con leptina fue apreciablemente menor que la de las ratas infectadas sin tratar.

6.3.3 Análisis macroscópico.

Después de 30 días de posinoculación se disecaron las tibias de ratas infectadas no tratadas y tratadas con leptina, así como de 2 ratas control y se colocaron en formol al 10%. Se retiró el tejido blando y se realizó la valoración macroscópica. Todas las tibias disecadas de las ratas no tratadas con leptina mostraron características de una infección ósea intensa: engrosamiento óseo por involucro intenso y deformación ósea marcada (producto de una reacción ósea intensa) y perforación del involucro (Figura 24). Las tibias control se ven sin signos de infección (Figura 24 A y 25 A). En 3 de las tibias disecadas de ratas tratadas con leptina 8 $\mu\text{g}/\text{día}/30$ días, observamos: engrosamiento óseo moderado, deformación ósea ligera con excepción de una y perforación del involucro en 2 casos. En las otras 2 tibias de ratas infectadas y tratadas vemos solo un ligero engrosamiento por lo demás se encuentran aparentemente sanas. (Figura 25 D y F).

El análisis macroscópico de las tibias de ratas tratadas con leptina por 30 días revela que son de mejor calidad (la intensidad de la infección es menor) que las tibias de ratas no tratadas.



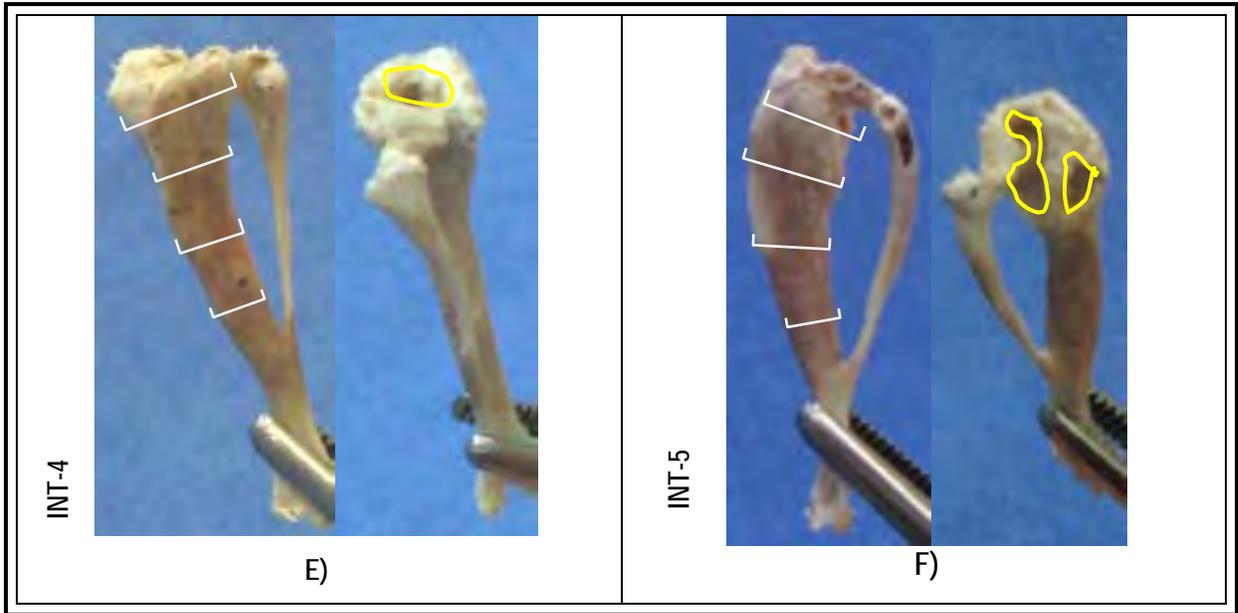
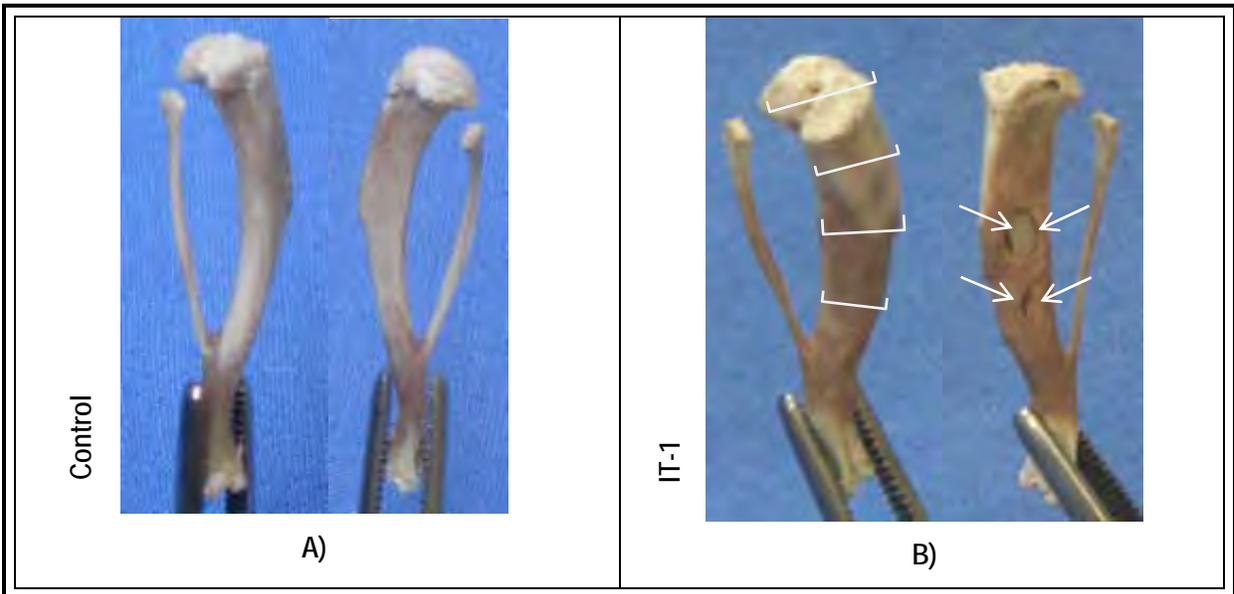


Figura 24. Imágenes de tibias infectadas de ratas no tratadas a 30 días pos inoculación. A) Tibia control inoculada con agar-agar al 0.4% sin signos de infección; en B y C engrosamiento óseo, pérdida de hueso en la región proximal de la articulación (perforación del involucro); en C se asoma la cortical y deformación ósea. Engrosamiento óseo (┌), cortical (↗) y perforación del involucro (⊖). INT (Infectadas no tratadas).



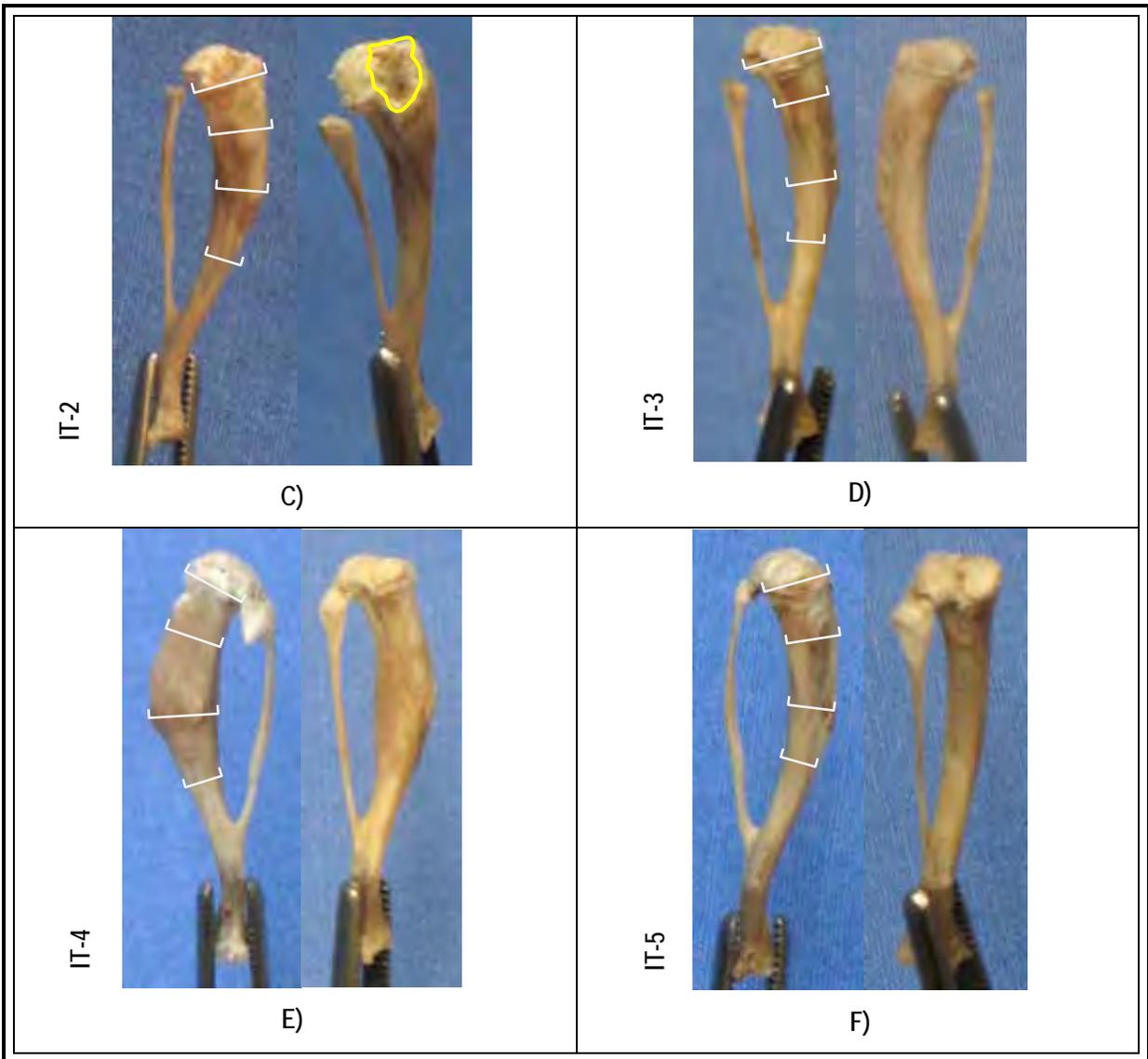


Figura 25. Imágenes de tibias infectadas de ratas tratadas con leptina a 30 días posinoculación. A) Tibia control inoculada con agar-agar al 0.4% sin signos de infección; en B se asoma la cortical; en C perforación del involucro; B y C muestran cierta deformación por engrosamiento óseo; en D y F ligera deformación y engrosamiento óseo y en E mayor deformación y engrosamiento óseo. Engrosamiento óseo (┌┐), cortical (↗) y perforación del involucro (⊂). IT (Infectadas tratadas).

6.3.4 Estudio radiográfico.

6.3.4.1 Valoración de la intensidad de la infección ósea. Utilizando la escala semicuantitativa descrita en el experimento I, valoramos la intensidad de la infección de tibias de ratas infectadas con 1×10^6 UFC de *S. aureus*, no tratadas y tratadas durante 30 días con leptina, mediante el estudio minucioso de imágenes radiográficas cráneo-caudales y medio-laterales de la extremidades infectadas de las ratas vivas apoyándonos en ocasiones en las imágenes radiográficas de las tibias disecadas (Figura 26 y 27). Los valores que obtuvimos se muestran en la Tabla 4.

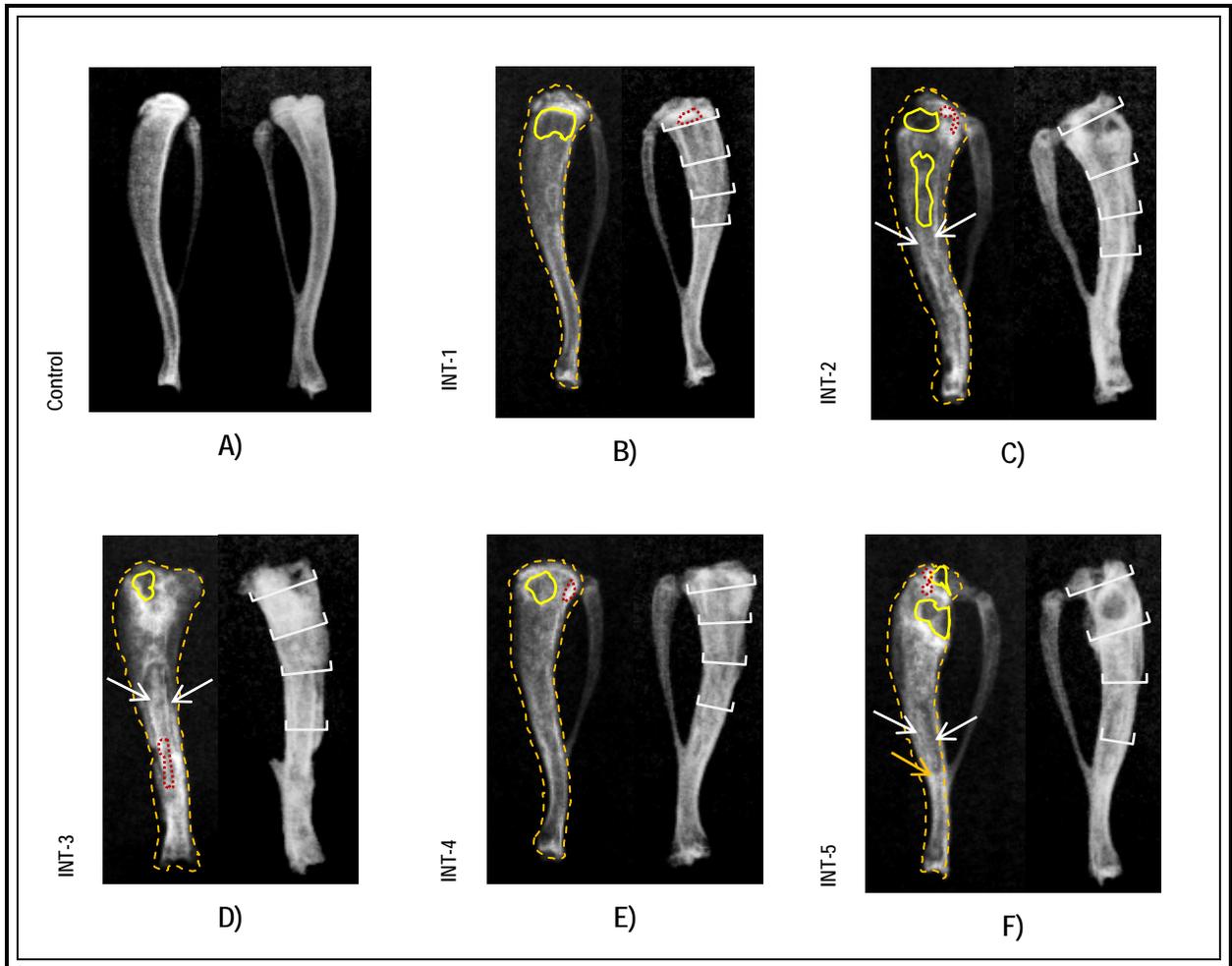


Figura 26. Imágenes radiográficas de ambos lados de las tibias infectadas disecadas de ratas no tratadas a 30 días posinoculación. A) Tibia control de rata inoculada con agar-agar al 0.4%; en B, C, D, E y F se señalan algunas de las características propias de un hueso con osteomielitis como: engrosamiento óseo (┌); reacción endóstica (┐); abscesos (○); adelgazamiento de las corticales (↘) y osteoesclerosis (⋯). INT (Infectada no tratada).

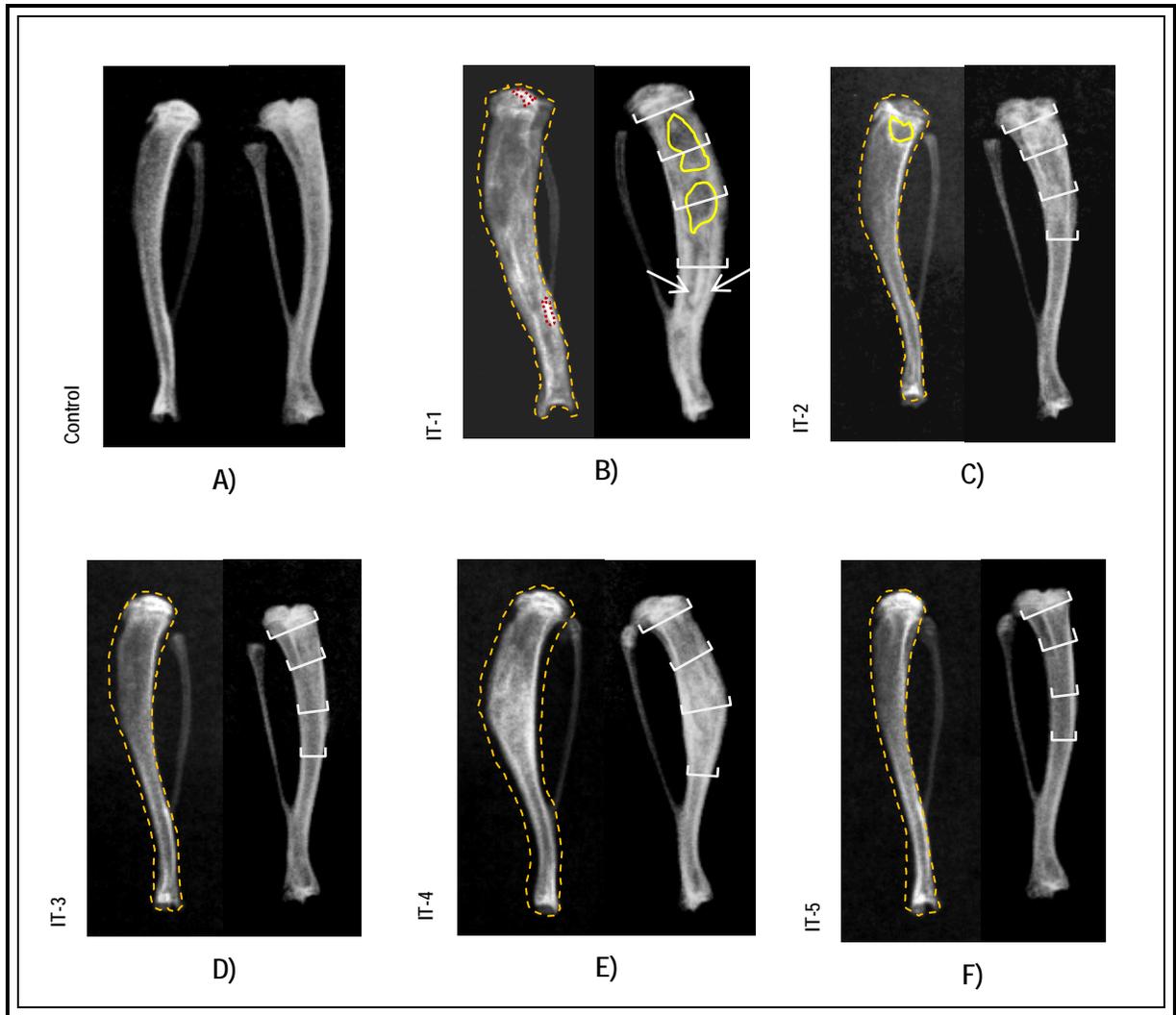


Figura 27. Imágenes radiográficas de ambos lados de las tibias infectadas disecadas de ratas tratadas con leptina a 30 días posinoculación. A) Tibia control de rata inoculada con agar-agar al 0.4%; en B, C, D, E y F se señalan algunas de las características propias de un hueso con osteomielitis como: engrosamiento óseo (┌─┐); reacción endóstita (→); abscesos (○); adelgazamiento de las corticales (↘) y osteoesclerosis (⋯). IT (Infectada tratada).

Tabla 4. Valoración radiográfica. Los valores resultados se obtuvieron aplicando la escala para valorar la intensidad de la infección de las tibias de ratas sin tratar y tratadas con leptina. Se evaluaron los parámetros a lo largo de la tibia.

RATA	Deformación	Involucro/engrosamiento	Engrosamiento del peroné	Adelgazamiento o y/o destrucción de corticales	Fractura de corticales	Secuestro	Osteoesclerosis	Reacción endóstica	Abscesos	PUNTAJE TOTAL
CONTROL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CONTROL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INF-CONTROL	2	2	2	3	0	0	0	0	2	11
INF-CONTROL	3	3	3	3	1	1	1	1	3	19
INF-CONTROL	3	3	3	3	1	1	0	0	2	16
INF-CONTROL	2	2	2	3	1	0	1	0	2	13
INF-CONTROL	3	3	2	3	1	1	0	0	2	15
INF-LEPTINA	3	3	1	3	1	1	0	0	3	15
INF-LEPTINA	2	2	0	0	0	0	0	0	1	5
INF-LEPTINA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INF-LEPTINA	2	2	0	0	0	0	0	0	2	8
INF-LEPTINA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

INF-CONTROL (Tibia infectada con 1×10^6 UFC)

INF-LEPTINA [Tibia infectada con 1×10^6 UFC + leptina (8 μ g/día/30 días)]

6.3.4.1.1 Análisis estadístico. Se llevo a cabo el análisis estadístico de t de Student. El puntaje total mostrado en la tabla 4 es la suma de la intensidad de los parámetros considerados en la escala radiográfica (deformación, involucro/engrosamiento, secuestro, fractura de corticales, etc) valorados a lo largo de la tibia. El análisis estadístico del grupo INF-CONTROL vs. INF-LEPTINA reveló diferencia significativa $p \leq 0.05$, lo cual mostró que las tibias de ratas infectadas y tratadas con leptina presentan una intensidad de la infección menor a las de las ratas infectadas no tratadas (Figura 28).

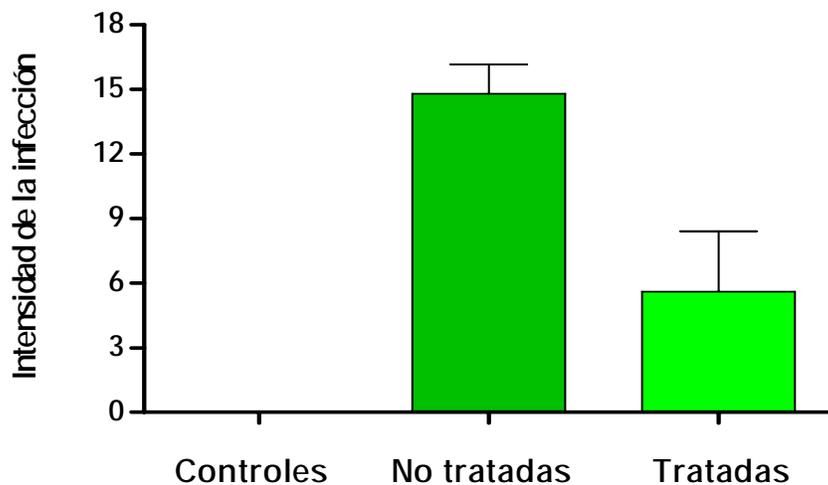


Figura 28. Valoración radiográfica. La intensidad de la infección disminuyó significativamente en el grupo de las ratas tratadas con respecto al de las ratas no tratadas $p \leq 0.05$.

6.3.5 Análisis tomográfico.

A partir de las reconstrucciones hechas por medio de imágenes tomográficas (Figura 29 y 30), se calculó el volumen de cada una de las tibia de las ratas no tratadas y tratadas con leptina así como de las tibias de las ratas control, estos resultados están resumidos en la tabla 5 y en la Figura 31.

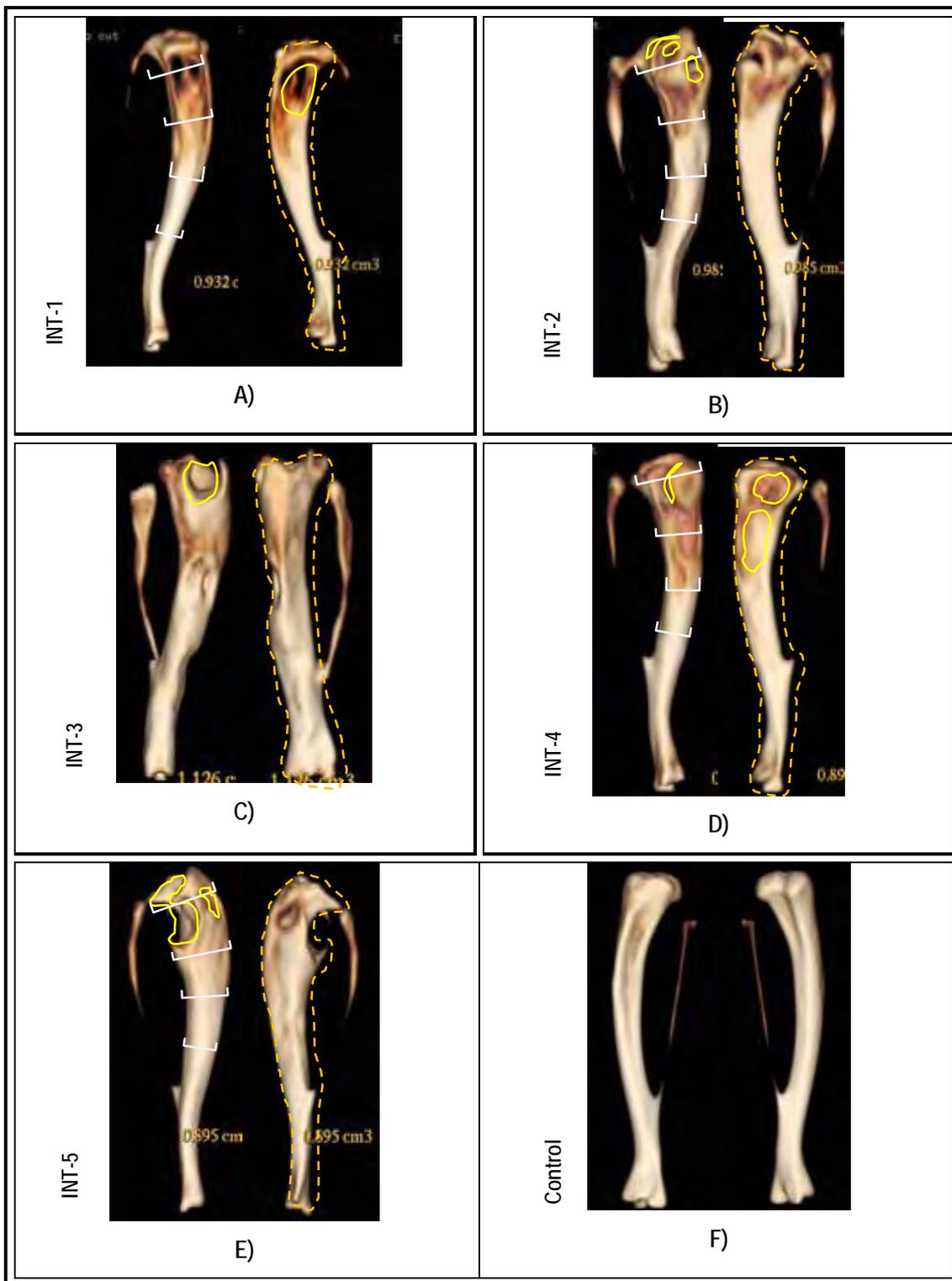


Figura 29. Imágenes tomográficas de tibias de ratas no tratadas a 30 días posinoculación. A) En A, B, C, D y E tibias infectadas no tratadas. Observamos: engrosamiento, deformación ósea y abscesos; F) tibia control, se encuentra sana. Engrosamiento óseo (┌), cortical (↘) y perforación del involucro/abscesos (⊂). INT (Infectada no tratada).

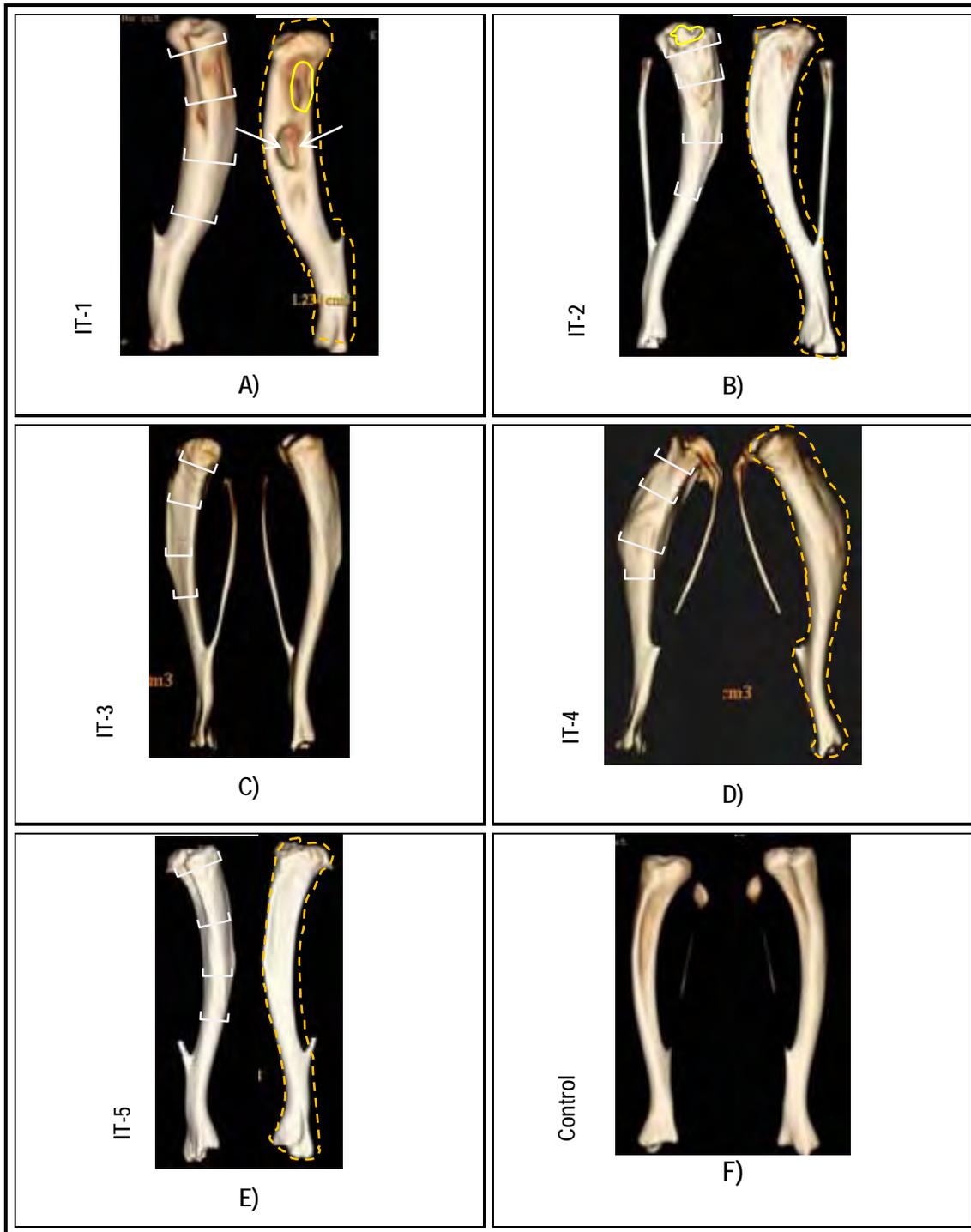


Figura 30. Imágenes tomográficas de tibias de ratas tratadas con leptina a 30 días posinoculación. A) En A, B, C, D y E tibias infectadas tratadas. Observamos: engrosamiento, deformación ósea y abscesos; F) tibia control, se encuentra sana. Engrosamiento óseo (L), cortical (↗) y perforación del involucro/abscesos (♡). IT (Infectada tratada).

En la Tabla 5 y Figura 31 A vemos que el volumen de las tibias infectadas no tratadas es ligeramente mayor que el de las tibias tratadas. Las tibias control presentan menor volumen que las infectadas.

Encontramos una relación directa del engrosamiento óseo con el aumento de volumen (a mayor volumen mayor engrosamiento óseo). El resultado de estas imágenes es comparable con el análisis macroscópico y radiológico con respecto a la intensidad de la infección, donde vemos que las tibias tratadas con leptina presentan una intensidad de infección reducida comparadas con las no tratadas (Figura 29 y 30).

En cuanto al peso no vemos diferencia entre las tibias tratadas y no tratadas. Las tibias control presentan un peso menor (Tabla 5 y Figura 31 B).

Tabla 5. Volúmenes y pesos de las tibias disecadas con y sin tratamiento con leptina.

Manejo experimental	Volumen, cm ³	Peso, g
Control	0.792	0.6897
Control	0.772	0.6681
1x10 ⁶ UFC ^a	0.933	0.7511
1x10 ⁶ UFC	0.985	0.7665
1x10 ⁶ UFC	1.126	0.9395
1x10 ⁶ UFC	0.896	0.7475
1x10 ⁶ UFC	0.895	0.7341
1x10 ⁶ UFC + leptina ^b	1.234	1.0252
1x10 ⁶ UFC + leptina	0.762	0.6557
1x10 ⁶ UFC + leptina	0.766	0.6595
1x10 ⁶ UFC + leptina	1.033	0.9796
1x10 ⁶ UFC + leptina	0.622	0.5909

^a UFC, unidades formadoras de colonias de *S. aureus* y ^b dosis de 8 µg/día/30 días

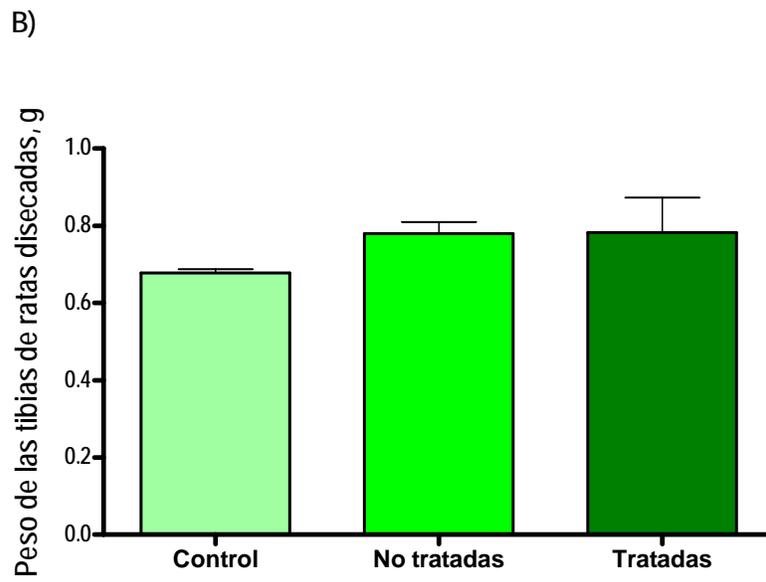
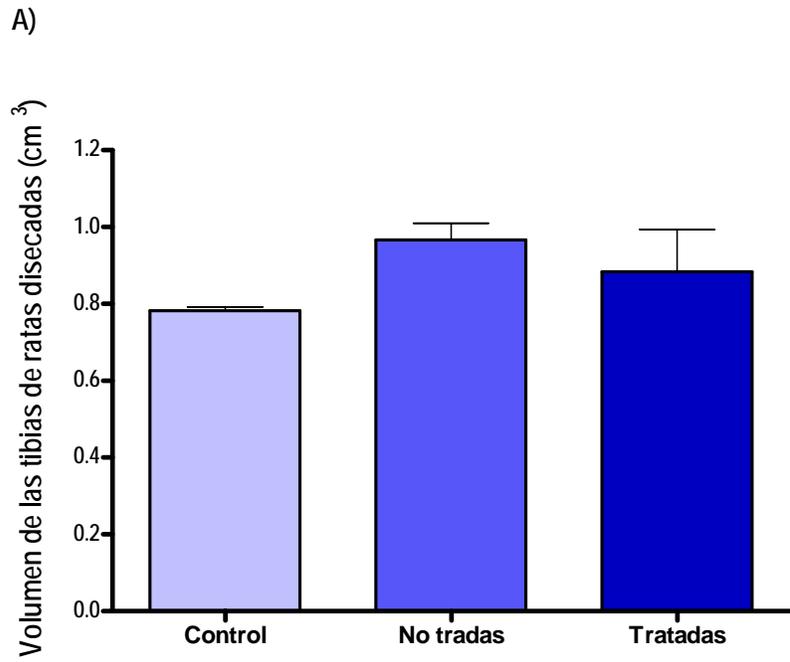


Figura 31. Volumen y peso de las tibias. El volumen y el peso de las tibias disecadas del grupo de las ratas tratadas con respecto al de las ratas no tratadas.

6.3.6 Estudio histológico.

6.3.6.1 Micrografías de cortes histológicos de tibias infectadas no tratadas: En los cortes histológicos de todas tibias de las ratas no tratadas observamos las características de un hueso con osteomielitis crónica: engrosamiento óseo por involucro, deformación ósea, quistes con y sin polimorfonucleares, tejido fibroso de las paredes del quiste y secuestros (Figura 32 A, B y C). Las micrografías de los cortes histológicos de las tibias control se ven sin signos de infección (Figura 32 D y 33 D).

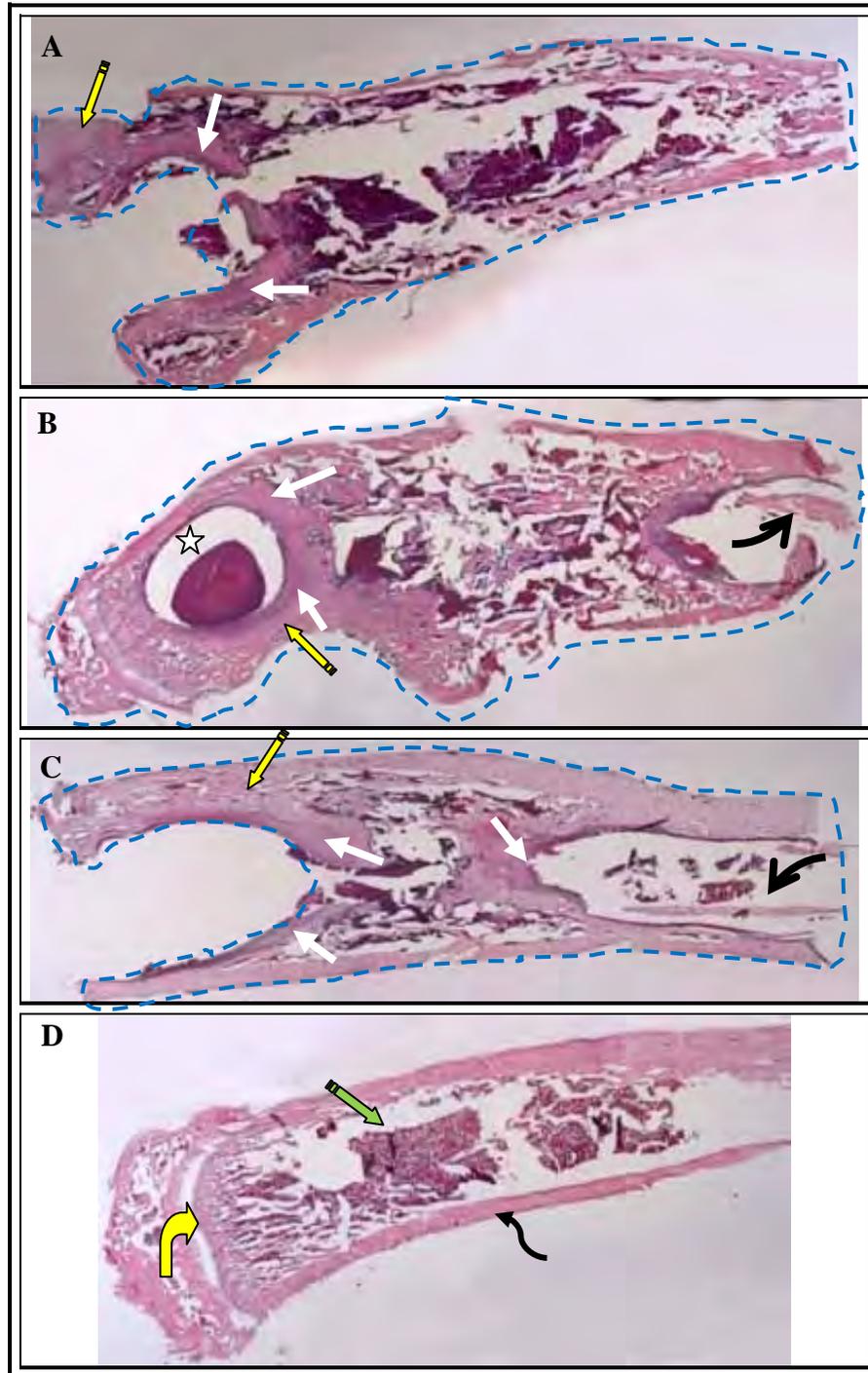


Figura 32. Micrografías de cortes histológicos de tibias de ratas no tratadas a 30 días posinoculación. A, B y C: Tibias de ratas no tratadas -engrosamiento por involucro () , deformación ósea () , tejido fibroso () de las paredes del quiste () y secuestros () ; D: tibia de rata control inoculada con agar-agar al 0.4% (objetivo 1X), médula ósea () , cortical () y placa de crecimiento () .

6.3.6.2 Micrografías de cortes histológicos de tibias infectadas tratadas con leptina: En las tibias disecadas tratadas con leptina 8 $\mu\text{g}/\text{día}/30$ días, observamos: engrosamiento óseo moderado, deformación ósea ligera y en una perforación por involucro (Figura 33). Las tibias se encuentran menos afectadas por la infección que las infectadas sin tratamiento con leptina (Figura 32 y 33).

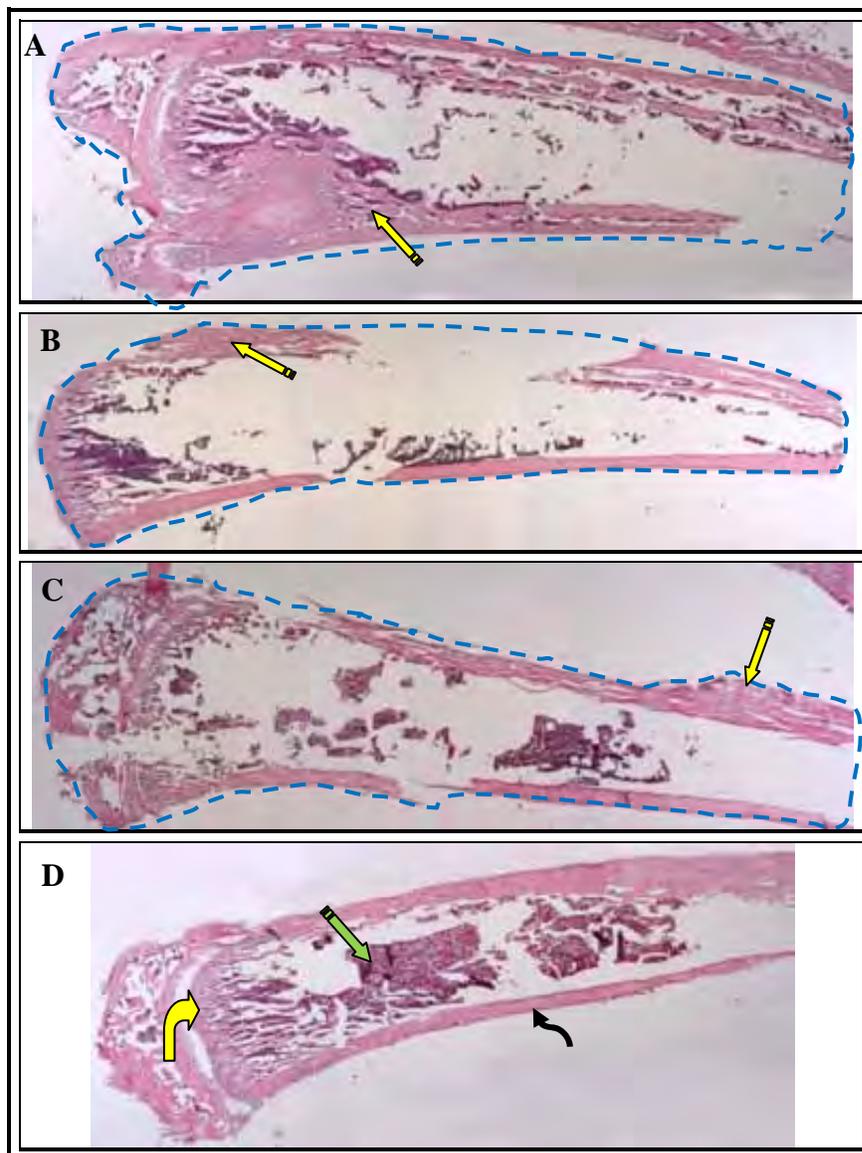


Figura 33. Micrografías de cortes histológicos de tibias de ratas tratadas con leptina a 30 días posinoculación. A, B y C: Tibias de ratas tratadas –moderado engrosamiento por involucro (), moderada deformación ósea (); D: tibia de rata control inoculada con agar-agar al 0.4% (objetivo 1X), médula ósea (), cortical () y placa de crecimiento ().

Desde el punto de vista del análisis histológico, las tibias de ratas tratadas con leptina por 30 días son de mejor calidad (la intensidad de la infección es menor) que las tibias de rata no tratadas.

6.3.6.3 Micrografías de alteraciones óseas específicas de osteomielitis. En la Figura 34 se muestran tibias infectadas no tratadas con secuestros e involucros, un secuestro dentro de un quiste en la Figura 35, encontramos tres tipos de quistes (Figura 36), médula ósea necrosada y sana, polimorfonucleares y abscesos en la Figura 37 y en la Figura 38 tejido fibroso en tibias infectadas no tratadas.

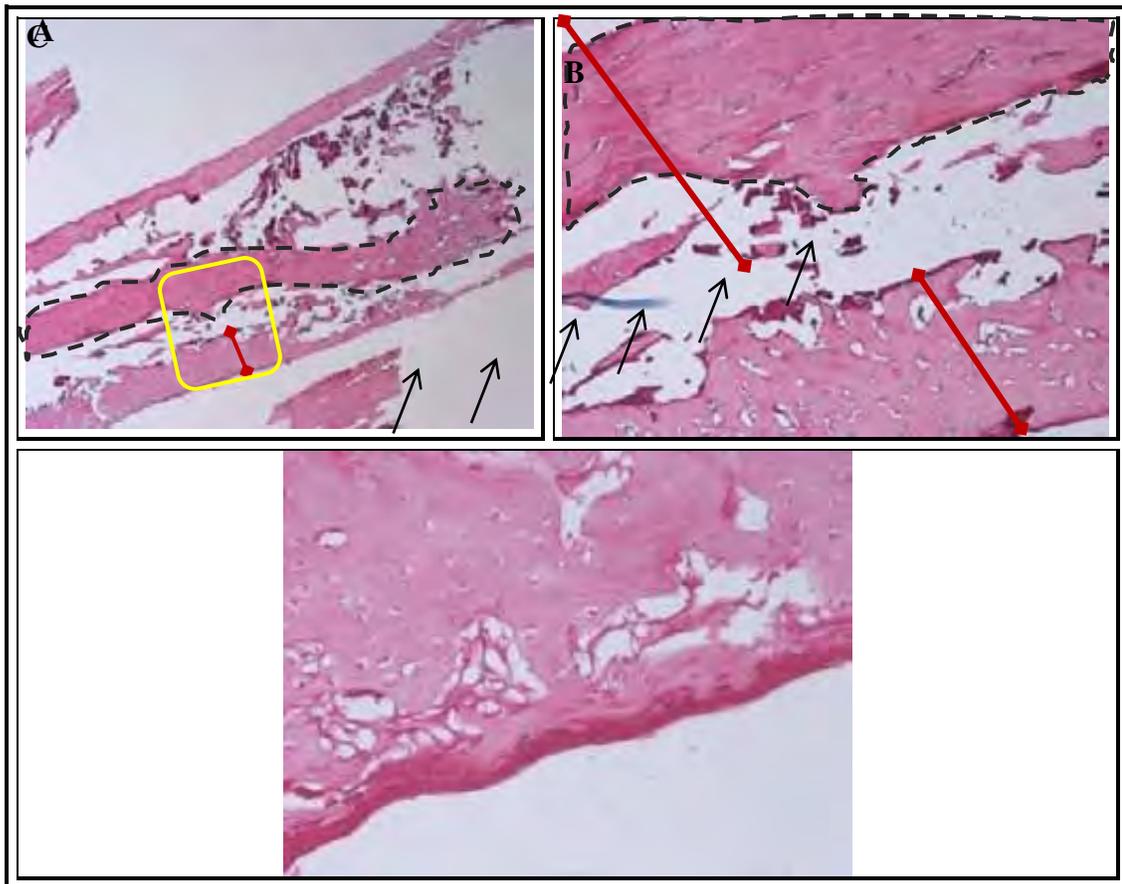


Figura 34. Micrografías de alteraciones óseas específicas debidas a la infección en tibias infectadas no tratadas: secuestros e involucros. A secuestro () e involucro () (objetivo 1X); B acercamiento de la cortical y el involucro enmarcado en A (objetivo 4X) y C capa de células del periostio () que generan el involucro () (objetivo 20X).

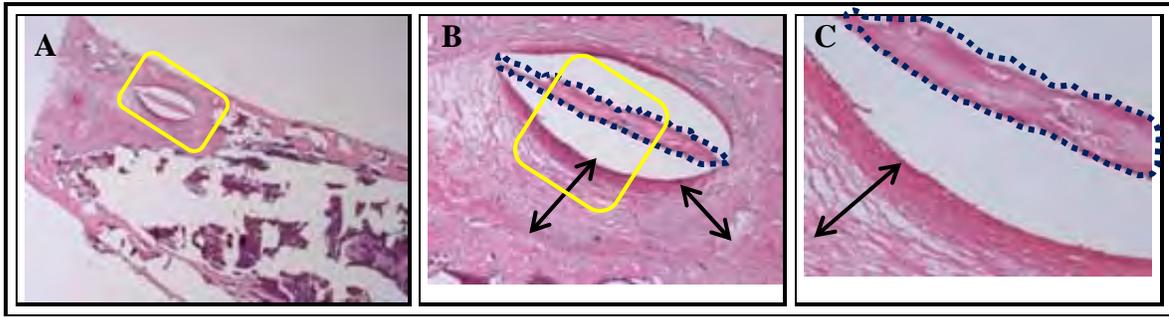


Figura 35. Micrografías de alteraciones óseas específicas debidas a la infección en tibias infectadas no tratadas: quistes y sequestrós. A sequestró dentro de un quiste (recuadro) (objetivo 1X); B acercamiento del sequestró () dentro del quiste enmarcado en A y tejido fibroso () de las paredes del quiste (objetivo 4X) y C acercamiento al sequestró y () tejido fibroso () en A y B (objetivo 10X).

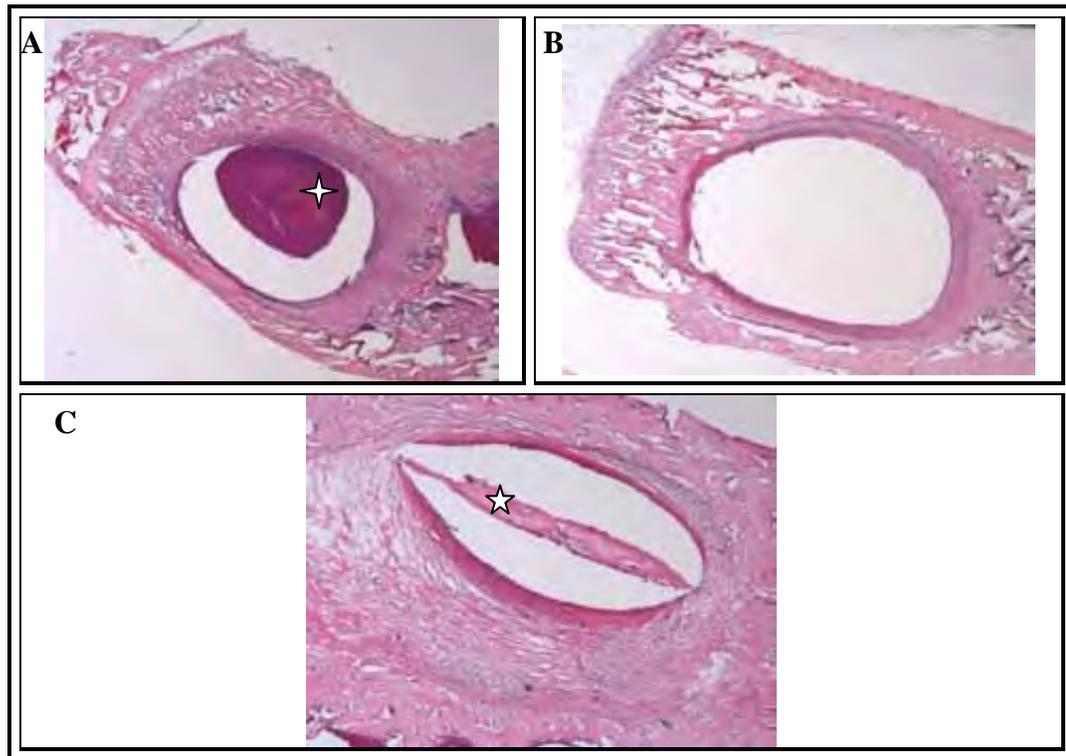


Figura 36. Micrografías de alteraciones óseas específicas debidas a la infección en tibias infectadas no tratadas: quistes. A con células polimorfonucleares () (objetivo 1X); B quiste vacío (objetivo 1X) y en C quiste con sequestró () (objetivo 4X).

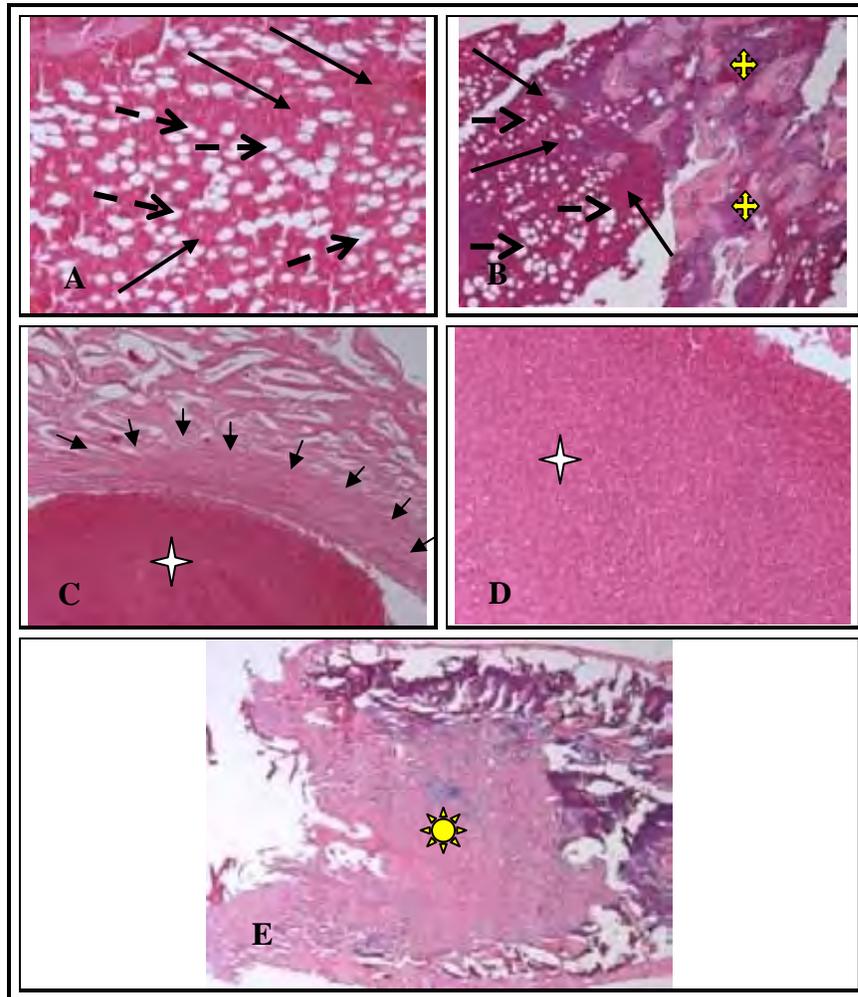


Figura 37. Micrografías de tibias infectadas no tratadas: médula ósea, polimorfonucleares y abscesos. A médula ósea sana (↗) con abundantes adipocitos (↘) (objetivo 20X); B del lado izquierdo de la imagen, médula ósea sana con abundantes adipocitos (↘) y del lado derecho médula ósea necrosada y/o absceso (⊕) (objetivo 4X); C células polimorfonucleares (☆) enquistadas y tejido fibroso del quiste (↗) (objetivo 4X); D acercamiento a las celular polimorfonucleares (☆) de C (objetivo 20X) y E absceso (☆) (objetivo 1X).

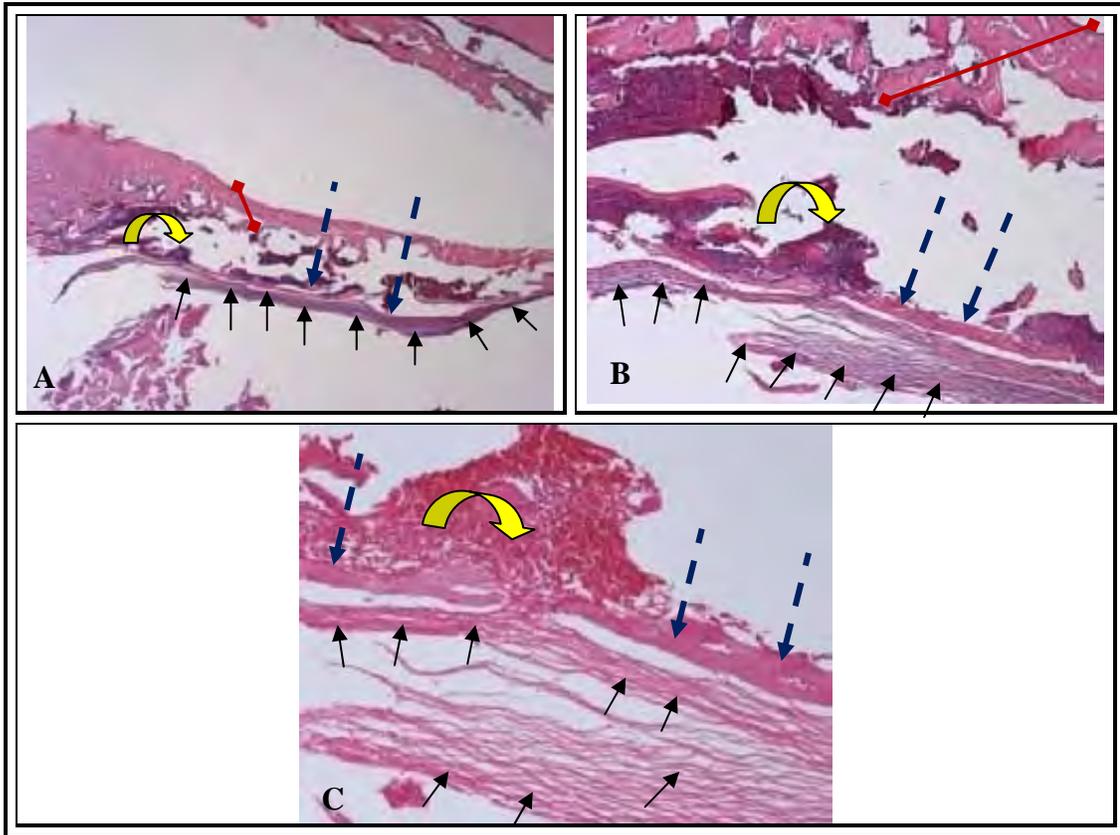


Figura 38. Micrografía de tejido fibroso en tibias infectadas no tratadas. A tejido fibroso (↗) dentro del canal medular a lo largo del hueso cortical (- ↗), involucro (↗) y células polimorfonucleares (↷) (objetivo 1X); en B acercamiento al recuadro en A tejido fibroso (↗); células polimorfonucleares (↷), hueso cortical (- ↗) e involucro (↗) (objetivo 4X) y C (objetivo 10X) acercamiento al recuadro de B tejido fibroso (↗), hueso cortical (- ↗) e infiltración de células polimorfonucleares (↷).

6.3.7 Estudio microbiológico de diversos tejidos recuperados de ratas infectadas y confirmación de la identidad de la cepa inoculada por técnicas bioquímicas.

Ninguna de las muestras tomadas de pulmón, bazo, hígado y sangre mostró presencia de bacteria, demostrándose así que la bacteria permaneció confinada a la extremidad infectada y no se propagó por el organismo de la rata.

Las muestras de abscesos y de canal medular del grupo de ratas no tratado y una del grupo de ratas tratado mostraron crecimiento (canal y en un absceso) en los medios de cultivo (Figura 39). Las propiedades bioquímicas mostraron las características de crecimiento de *S. aureus*.

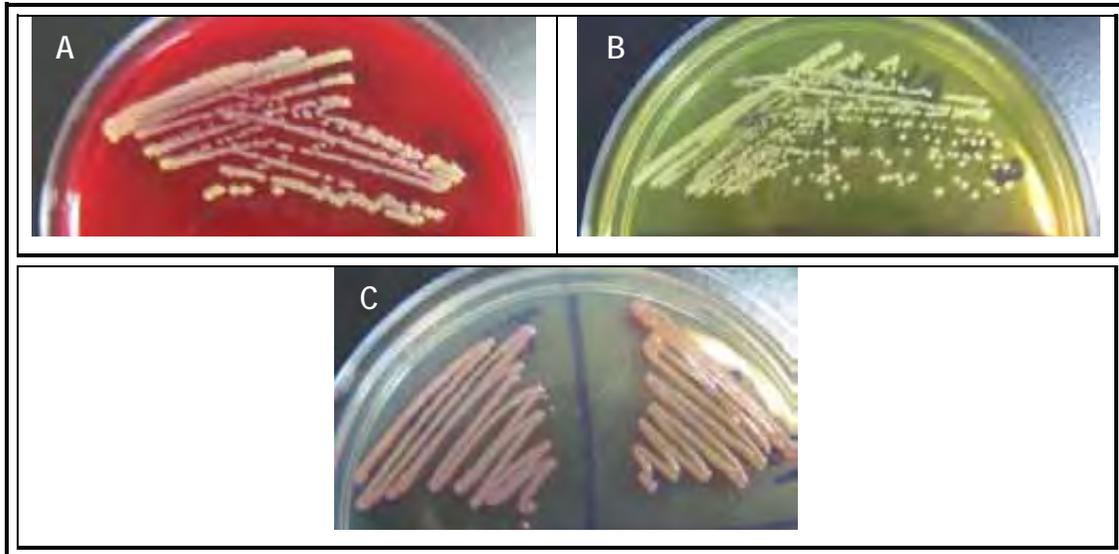


Figura 39. Resultados de los cultivos de muestras de tejidos. A) Cultivo positivo en agar-sangre; B) cultivo positivo en agar-sal y manitol y C) cultivo positivo en CHROM-agar.

6.4 Conclusiones experimento II

Durante el seguimiento clínico las extremidades de las ratas infectadas tratadas con leptina con las ratas infectadas sin tratar pudimos apreciar el efecto protector de la hormona.

El estudio radiológico de las tibias infectadas tanto en el animal como en su forma disecada de las extremidades infectadas de las ratas tratadas con leptina: mostraron involucros, mucha menor deformación ósea, sin perforaciones, evidenciando un proceso infeccioso mucho menos intenso.

En el análisis tomográfico, observamos una correlación numérica confiable del volumen y el grado de deterioro de las extremidades infectadas. El menor volumen fue de las tibias controles, el mayor volumen fue de las tibias infectadas sin tratar y las tibias infectadas tratadas con leptina mostraron un volumen intermedio entre las primeras y las segundas.

En el análisis histológico de los cortes de hueso observamos la alteración del tejido óseo debido a la infección a diferencia de los tratados con leptina en donde el tejido se encuentra en mejores condiciones generales, aunque no

es un tejido completamente sano se ve de mejor calidad que el de las no tratadas e intermedio entre las no tratadas y las inoculadas solo con agar-agar. El involucro de los cortes de las tibias tratadas con leptina es de menor grosor y vemos las corticales muy conservadas, podemos ver médula ósea sana en la que observamos células adiposas entre la médula y no observamos abscesos en los cortes de las tratadas con leptina.

Detectamos la presencia de bacteria (*S. aureus* 76 IQM) sólo en un caso en la tibia de una rata tratada con leptina sin contaminación con ninguna otra forma bacteriana. El análisis bioquímicas de la bacteria recuperada coincidió con su caracterización de preinoculación.

La intensidad de la infección de tibias de ratas infectadas con *S. aureus* y que recibieron leptina durante 30 días posinoculación fue notablemente menor a la de las tibias de ratas infectadas no tratadas.

VII DISCUSIÓN

En este trabajo, estudiamos el efecto de la leptina sobre la intensidad de la infección en un modelo de osteomielitis en tibia de rata desarrollado con un inóculo de *S. aureus* 76 IQM. Para ello, se administró leptina de forma local en la extremidad infectada y se siguió el proceso infeccioso por medio de diferentes estudios. La aplicación de leptina produjo la disminución de la intensidad de la infección en las tibias de ratas infectadas al compararlas con las tibias de ratas infectadas no tratadas.

7.1 Modelo de osteomielitis estafilocócica en la tibia de la rata

Dado su alto grado de virulencia (Martínez-Canseco, 1999) la cepa de *S. aureus* 76 IQM indujo una osteomielitis en la tibia de rata que simula infecciones osteomielíticas naturales como las que ocurren en el hueso (Power et al., 1990). Para inducir la infección ósea no hubo necesidad de utilizar ningún agente esclerosante (Zak et al., 1982; Brin et al., 2008) como el morruato de sodio (Rissing et al., 1985 a; Rouse et al., 2006) o ácido araquidónico (Rissing et al., 1985 b), que unos autores opinan pudiera interferir en el desarrollo del proceso natural (Monzón et al., 2002; Lucke et al., 2003) contribuyendo a la respuesta inflamatoria y reabsorción ósea (Gomis et al., 2000), tampoco empleamos cuerpos extraños dentro del canal medular como el clavo de Kirchner estéril (Lucke et al., 2003) o el clavo preconalizado con *S. aureus* (Monzón et al., 2002).

La inoculación de la bacteria suspendida en agar directamente en el canal medular resultó en un modelo en la rata de osteomielitis crónica y progresiva de alta reproducibilidad y baja mortalidad. Solo una de 30 ratas no se infectó y solo 2 de 30 murieron por sepsis. Inesperadamente la intensidad de la infección y contrario a las observaciones de Norden y Kennedy, 1970 y Lucke et al., 2003.

La intensidad de la infección no se correlacionó con la concentración de la bacteria inoculada, aunque el estado de salud general de las ratas infectadas con 1×10^6 UFC fue mucho mejor que las infectadas con 39×10^6 UFC. Por ello se decidió evaluar el efecto de la leptina en ratas infectadas con 1×10^6 UFC.

7.1.1 Escala radiográfica semicuantitativa. Para valorar la intensidad de la infección por medio de estudios radiográficos, se diseñó una escala radiográfica semicuantitativa de parámetros osteomielíticos (deformación ósea, fractura de corticales, secuestros, etc.) a partir de radiografías tomadas a tibias de ratas *in situ* y disecadas inoculadas con *S. aureus* 76 IQM. La escala es preliminar y se encuentra en proceso de validación.

7.2 Mecanismo de acción de la leptina sobre la osteomielitis

El efecto protector de la leptina sobre la osteomielitis en nuestro modelo, pudiera relacionarse con ciertos efectos de la leptina como: la regulación del sistema inmune (La Cava et al., 2004), la acción sobre procesos inflamatorios (Fantuzzi y Faggioni, 2000), una posible acción bactericida (Caldefie-Chezet, et al., 2001) y/o una acción directa sobre el metabolismo de los osteoblastos (Burguera y Reseland et al., 2001).

7.2.1 Respuesta inmune. La leptina tiene un papel importante en las respuestas inmune innata y adaptativa a diferentes niveles (La Cava et al., 2004): En el sistema inmune innato, la leptina promueve la activación de la fagocitosis al estimular monocitos/macrófagos que liberan citocinas de respuesta de fase aguda, promueven la quimiotaxis de neutrófilos que libera especies reactivas de oxígeno y activan directamente a las células asesinas naturales (natural killer) *in vivo* e *in vitro*. En el sistema inmune adaptativo, la leptina estimula la proliferación de células T y además activa y promueve la migración de células al sitio de inflamación. Se han encontrado alteraciones tanto en la respuesta inflamatoria como en la repuesta inmune en animales deficientes en leptina (*ob/ob*) o que no expresan su receptor (*db/db*). En algunos modelos la administración exógena de leptina, contribuye a la recuperación de la respuesta inmune mediada (Fantuzzi et al., 2000).

Los niveles de leptina pueden variar en respuesta a diferentes tipos de infección. Algunos estudios reportan incremento en los niveles de leptina durante la infección bacteriana e inflamación (Fantuzzi et al., 2000; Bernotiene et al., 2004), en otros no se encontró un incremento de leptina en condiciones inflamatorias, incluyendo endotoxemia experimental aguda o síndrome de inmunodeficiencia adquirida (La Cava et al., 2004; Bernotiene et al., 2004). Del mismo modo se ha reportado una disminución en la concentración de leptina en pacientes con tuberculosis (Crevel et al., 2002) así como en ratones (C57BL/6 y NMRI) al administrarles una inyección intravenosa de *S. aureus* (Hultgren et al., 2001). En este caso, se encontró que al aplicar una inyección intra-articular generando un modelo de artritis séptica la leptina disminuyó la intensidad de la infección y paralelamente disminuyó la inflamación, sin afectar la supervivencia de la bacteria, los autores atribuyeron este efecto a la disminución en la concentración de IL-6.

7.2.2 Efecto bactericida. En general la leptina parece incrementar la actividad de fagocitosis y por lo tanto pudiera contribuir a la defensa del organismo como un agente bactericida (Bernotiene et al., 2004). La leptina activa directamente a los neutrófilos y retarda la apoptosis de estas células. En consecuencia, las especies reactivas de oxígeno que producen estas células ejercen su efecto bactericida por un tiempo extendido (Caldefie-Chezet et al., 2001). En la mayoría de las extremidades infectadas tratadas con leptina no encontramos bacteria a excepción de una. Contrario a su acción en un modelo de artritis séptica (Hultgren et al., 2001, estos resultados podrían atribuirse a la posible acción bactericida de la leptina en nuestro modelo.).

7.2.3 Acción directa sobre el hueso. La leptina actúa por mecanismos autócrinos y endócrinos sobre el metabolismo óseo (Reseland et al., 2001). Thomas en 1999 menciona que la leptina tiene un efecto local activando la diferenciación de osteoblastos y Holloway en el 2002 propone que la leptina producida en el microambiente de la médula ósea es más importante en la regulación del metabolismo óseo que la que se encuentra en la circulación. Estas acciones de la leptina podrían estar estimulando la síntesis de hueso de mejor calidad y al mismo tiempo reducir la degradación ósea en el grupo de ratas infectadas tratadas.

La osteomielitis es una enfermedad que requiere de investigación continua que lleve a la prevención y/o recuperación en menor tiempo. En este trabajo encontramos que la aplicación de leptina disminuyó el proceso

infeccioso, en tibias de ratas inoculadas con *S. aureus*. La leptina modula diversos mecanismos inmunes, inflamatorios y óseos, es necesario continuar estudiando el efecto sobre la osteomielitis y llegar a conocer el mecanismo o mecanismos por los que contribuye a la disminución de la intensidad de la infección.

VIII CONCLUSIONES

- Generamos un modelo de osteomielitis con concentraciones decrecientes de *S. aureus* 76 IQM.
- Desarrollamos una escala radiográfica semicuantitativa para valorar la intensidad de la infección.
- El tratamiento con leptina en el modelo de osteomielitis en tibia de rata Wistar inoculada con 1×10^6 UFC de *S. aureus* 76 IQM disminuyó la intensidad de la infección.

IX PERSPECTIVAS

La intención ahora es obtener un mejor entendimiento del mecanismo de acción de la leptina en el control de la infección ósea en nuestro modelo de osteomielitis estafilocócica en la tibia de la rata. El plan de trabajo involucra la medición del efecto de la leptina sobre los niveles séricos de citocinas proinflamatorias así como la determinación de su efecto sobre la celularidad y metabolismo óseo.

Está reportado que aumentan los niveles de IL-1, IL-6, IL-12 y FNT- α en respuesta a infecciones ósea (Bost et al., 1999), y que la administración de leptina a ratas con artritis séptica inducida con *S. aureus* intravenoso disminuye la intensidad de la infección paralelamente con la disminución en los niveles séricos de IL-6 (Hultgren et al., 2001). Es muy probable que se dé una situación similar en el caso de nuestras ratas osteomielíticas tratadas con leptina.

Es factible también que la leptina ejerza un efecto sobre la celularidad y metabolismo óseo de las tibias de las ratas osteomielíticas. Los osteoblastos poseen receptores de leptina (Lee et al., 2002; Gordeladze., et al 2002) que se sabe, regulan la expresión de los componentes del sistema RANK/OPG/RANKL (Burguera et al., 2001; Holloway et al., 2002) y con ello la osteoclastogénesis (Holloway et al., 2002).

X BIBLIOGRAFÍA

- Asociación mexicana de infectología y microbiología clínica, A.C. Infecciones de hueso y articulaciones 1998. <http://www.drscope.com/pac/infecto-1/a3/index.htm> Fecha: Octubre 2008
- Bernotiene E, Palmer G, Gabay C. The role of leptin in innate and adaptive immune responses. *Arthritis Res Ther* 8 (2006) 217-227
- Bost K, Ramp W, Nicholson NC, Benton JL, Marriot I, Hudson MC. *Staphylococcus aureus* infection of mouse or human osteoblasts induces high levels of interleukin-6 and interleukin-12 production. *J Infect Dis* 180 (1999) 1912-1920
- Brady R, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW, Shirliff ME. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52 (2008) 13-22
- Brin YS, Golenser J, Mizrahi B, Maoz G, Domd AJ, Peddada S, Tuvia S, Nyska A, Nyska M. Treatment of osteomyelitis in rats by injection of degradable polymer releasing gentamicin. *J Control Release* 131 (2008) 121-127
- Burguera B, Hofbauer LC, Thomas T, Gori F, Evans GL, Khosla S, Riggs BL, Turner RT. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology* 142 (2001) 3546-3553
- Caldefie-Chezet F, Poulin A, Tridon A, Sion B, Vasson M-P. Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action? *J Leukoc Biol* 69 (2001) 414-418
- Calhoun JH, Manring MM. Adult osteomyelitis. *Infect Dis Clin North Am* 19 (2005) 765-786
- Cianpolini J, Harding KG. Pathophysiology of chronic bacterial osteomyelitis. Why do antibiotics fail so often? *Postgrad Med J* 76 (2000) 479-483
- Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100 (2000) 197-207
- Faber Ch, Stallmann P, Lyaruu DM, Joosten U, Eiff CH, Amerongen A, Wuisman P. Comparable efficacies of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 and gentamicin in a chronic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis model. *Antimicrob Agents Chemother* 49 (2005) 2438-2444
- Faggioni R, Feingold K, Grunfeld C. Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. *FASEB J* 15 (2001) 2565-2571
- Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 4 (2000) 437-446
- Franco-Bourland RE. Vasopressinergic, oxytocinergic, and somatostatinergic neuronal activity after adrenalectomy and immobilization stress. *Neurochem Res* 23 (1998) 699-705
- Franco-Bourland RE, Vergara-Fernández HJ. Efecto osteoinductivo de leptina recombinante de rata en un modelo experimental de rata con fractura de tibia y peroné. Estudio piloto. *Acta Ortop Mex* 17 (2003) 184-187

- Frank S, Stallmeyer B, Kämpfer H, Kolb N, Pfeilschifter J. Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair. *J Clin Invest* 106(2000) 501-509
- Gómez-Pineda A, Cicero-Álvarez A, Escobedo-Troncoso V, Olivares-Peréz C, León-Hernández S, Martínez-Canseco C. Factores pronósticos de no unión en pacientes con infección ósea secundaria a fracturas traumáticas tratadas y estabilizadas con método Colchero. *Cir Ciruj* 76 (2008) 381-385
- Gomis M, Barberán J, Ariza J. Modelos experimentales de osteomielitis. En: Miró JM, Gatell JM. Miró JM, Gatell JM Modelos experimentales en patologías infecciosas. Monografías Dr. Antonio Esteves. Ed. Fundación Dr. Antonio Esteves. Barcelona (2000) 149-161 Edit. Monografías Dr. Antonio Esteves. Barcelona España 2000; pp. 149-161
- Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J Cell Biochem* 85 (2002) 825-836
- Hernández-Arellano MP. Caracterización de un modelo de osteomielitis estafilocócica en rata. Tesis de Maestría en Ciencias, UNAM, Maestría en Ciencias de la Salud y la Producción Animal, 2005
- Holloway WR, Collier Fm, Aiken CJ, Myers DE, Hodge JM, Malakellis M, Gough TJ, Collier GR, Nicholson GC. Leptin inhibits osteoclast generation. *J Bone Miner Res* 17(2002) 200-209
- Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL, Spurlock ME. The biology of leptin: A review. *J Anim Sci* 76 (1998) 1405-1420
- Hultgren O, Tarkowski A. Leptin in septic arthritis: decreased levels during infection and amelioration of disease activity upon its administration. *Arthritis Res* 3 (2001) 389-394
- Kandemir O, Oztuna V, Colak M, Akdag A, Camdeviren H. Comparison of the efficacy of tigecycline and teicoplanin in an experimental methicillin resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis model. *J Chemother* 20 (2008) 53-57
- Kaplan SL. Osteomyelitis in children. *Infect Dis Clin North Am* 19 (2005) 787-797
- La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 4 (2004) 371-9
- Lazzarini L, Mader J, Calhoun J. Osteomyelitis in long bones. *J Bone Joint Surg Am* 86-A (2004) 2305-2318
- Lee YJ, Park JH, Ju SK, You KH, Ko JS, Kim HM. Leptin receptor isoform expression in rat osteoblasts and their functional analysis. *FEBS Lett* 528 (2002) 43-47
- Lew D, Waldvogel F. Osteomyelitis. *N Engl J Med* 336 (1997) 999-1007
- Lew D, Waldvogel F. Osteomyelitis. *Lancet* 364 (2004) 369-379
- Littlewood-Evans AJ, Hattenberger M, Zak O, O'Reilly T. Effect of combination therapy of rifampicin and azithromycin on TNF levels during a rat model of chronic osteomyelitis. *J Antimicrob Chemother* 39 (1997) 493-498
- Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Stemberger A, Haas NP, Raschke M. A new model of implant-related osteomyelitis in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 67 (2003) 593-602

- Martínez-Canseco CJ. *Staphylococcus aureus*: caracterización fenotípica y genotípica de aislados clínicos causantes de osteomielitis crónica. Tesis de Maestría en Ciencias con Especialidad en Biomedicina Molecular. IPN, CICATA, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Programa Institucional de Biomedicina Molecular, 1999
- Matarese G, Leiter E, La Cava A. Leptin in autoimmunity: many questions, some answers. *Tissue Antigens* 70 (2007) 87-95
- Matarese G, Moschos S, Mantzoros C. Leptin in immunology. *J Immunol* 173 (2005) 3137-3142
- Merino JM, Carpintero I, Marrero M, Ansón S. Osteomielitis aguda: características clínicas, radiológicas, bacteriológicas y evolutivas. *An Esp Pediatr* 55 (2001) 20-24
- Monzón M, García-Álvarez F, Laclériga A, Amorena B. Evaluation of four experimental osteomyelitis infection models by using precolonized implants and bacterial suspensions. *Acta Orthop Scand* 73 (2002) 11-19
- Nordent CW, Kennedy E. Experimental osteomyelitis I. A description of the model. *J Infect Dis* 122 (1970) 410-418
- Pineda C, Vargas A, Yargas A. Imaging of osteomyelitis: current concepts. *Infect Dis Clin N Am* 20 (2006) 789-825
- Power ME, Olson ME, Domingue PAG, Costerton JW. A rat model of *Staphylococcus aureus* chronic osteomyelitis that provides a suitable system for studying the human infection. *J Med Microbiol* 33 (1990) 189-198
- Randall W King NIH/National Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases Information Clearinghouse One AMS Circle Bethesda MD 20892-3675 301.495.4484. <http://www.niams.nih.gov/> Fecha: octubre 2008
- Reseland JE, Syversen U, Bakke I, Qvigstad G, Eide LG, Hjertner O, Gordeladze JO, Drevon CA. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J Bone Miner Res* 16 (2001) 1426-1433
- Rissing PJ, Buxton TB, Weinstein RS, Shockley RK. Model of experimental chronic osteomyelitis in rats. *Infect Immun* 47 (1985a) 581-586
- Rissing PJ, Buxton TB, Fisher J, Harris R, Shockley RK. Arachidonic acid facilitates experimental chronic osteomyelitis in rat. *Infect Immun* 49 (1985b) 141-144
- Rouse MS, Piper KE, Jacobson M, Jacofsky DJ, Steckelberg JM, Patel R. Daptomycin treatment of *Staphylococcus aureus* experimental chronic osteomyelitis. *J Antimicrob Chemother* 57 (2006) 301-305
- Spangolo N, Greco F, Rossi A, Ciolli L, Teti A, Posteraro P. Chronic Staphylococcal osteomyelitis: a new experimental rat model. *Infect Immun* 61 (1993) 5225-5230
- Thomas T, Gori F, Kholza S, Jensen MD, Burguera B, Riggs BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology* 140 (1999) 1630-1638

- Velázquez-Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. Salud Publica Mex 47 (2005) 381-387
- Zak O, Zak F, Rich R, Tosch W, Kradolfer R, Scheld WM. Experimental staphylococcal osteomyelitis in rats: therapy with rifampin and cloxacillin alone or in combination. En: Periti P, Grassi GG, editors. Current chemotherapy and immunotherapy. Washington: American Society for Microbiology, 1982; 973-974
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372 (1994) 425-432