

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS**

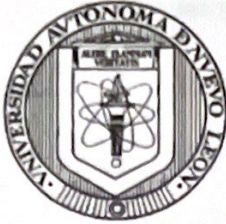
**EFFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS  $TiO_2$ -Ag,  $TiO_2$ -V y  $TiO_2$ -Gd EN  
EL ACTINOMICETOMA POR *Nocardia brasiliensis***

**POR:**

**MCP. CÉSAR VIDAL ELIZONDO SOLIS**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con  
orientación en Inmunología Médica**

**Octubre, 2023**



**EFFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS  $TiO_2$ -AG,  $TiO_2$ -V Y  $TiO_2$ -GD  
EN EL ACTINOMICETOMA POR *Nocardia brasiliensis***

Aprobación de Tesis:

Dr. C. Mario César Salinas Carmona  
Director de Tesis

Dr. C. Noé Macías Segura  
Co-Director de Tesis

Dr. med. Carlos Eduardo Medina De la Garza  
Comisión de Tesis

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## DEDICATORIA

A todas las personas curiosas y que se cuestionan incansablemente el porqué de las cosas.

סוף מעשה במחשבה תחלה

שלמה אלקבץ

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por concederme la vida.

A mi familia, por su constante apoyo y confianza en todas mis decisiones. Su presencia ha sido fundamental en mi camino, dándome la claridad para avanzar en mis proyectos y les estoy profundamente agradecido.

Al Dr. Salinas, mi Director de Tesis, le expreso mi profunda gratitud por impartirme valiosas enseñanzas y proporcionarme orientación, enriqueciendo mi visión de la ciencia y siendo crucial en mi desarrollo académico.

Al Dr. Noé, mi Co-Director de Tesis, por su cercanía y apoyo constante a lo largo de este proceso, por brindarme la oportunidad de involucrarme en proyectos adicionales que han impactado significativamente en mi formación.

Al Dr. Medina, le agradezco por su asesoría constante y por mantenerse siempre atento a mi progreso académico.

A los profesores del Servicio de Inmunología, les agradezco por compartir generosamente su conocimiento y por su disposición siempre presente para brindarme su apoyo.

A mis compañeros del Posgrado de Inmunología, les estoy agradecido por sus valiosos consejos, los cuales fueron esenciales para mi mejora y desarrollo.

A mis compañeros de generación de la Maestría, Gali, Chris y Amairani, les agradezco por su amistad, apoyo y por hacer más llevadero este proceso, contribuyendo a mi crecimiento personal.

Al grupo de Becarios del Laboratorio de Inmunología de Sistemas, Mafer, Mariana, Emilio y Kelly, les agradezco por su apoyo incondicional durante estos dos años, por su amistad y por siempre estar dispuestos a dar lo mejor de sí.

**EFFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS TiO<sub>2</sub>-Ag,  
TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd EN EL ACTINOMICETOMA POR *Nocardia  
brasiliensis***

Presentado por:

**M.C.P. César Vidal Elizondo Solis**

Este trabajo se realizó en el Servicio y Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Mario César Salinas Carmona y co-dirección del Dr. C. Noé Macías Segura.



---

Dr. C. Mario César Salinas Carmona  
Director de Tesis



---

Dr. C. Noé Macías Segura  
Co-Director de Tesis

# RESUMEN

**M.C.P. César Vidal Elizondo Solís**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Medicina**

**Título del estudio: EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd EN EL ACTINOMICETOMA POR *NOCARDIA BRASILIENSIS***

**Número de páginas: 81**

**Área de estudio:** Inmunología

**Propósito y Método de estudio:**

**Propósito y Método de estudio:** El micetoma, una enfermedad crónica causada por la infección de hongos o bacterias, afecta predominantemente a las poblaciones rurales. En México, el agente causal más común es *Nocardia brasiliensis*. La creciente resistencia a los antibióticos representa un desafío en el tratamiento de diversas infecciones, incluyendo el actinomicetoma causado por *Nocardia brasiliensis*. Ante esta situación, se ha hecho imperativo buscar nuevas alternativas terapéuticas. Las nanopartículas (Np) han surgido como una opción prometedora, y este estudio se enfoca en evaluar la eficacia de tres nanopartículas bimetálicas en el tratamiento del actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*: TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>Gd. La metodología del estudio se dividió en tres fases. Primero, se evaluó *in vitro* el efecto de las Np de TiO<sub>2</sub>Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd mediante pruebas de susceptibilidad microdiluciones seriadas, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima letal (CML). En la segunda fase, se investigó la citotoxicidad de las Np en esplenocitos de ratón BALB/c. Finalmente, se administraron las Np vía intralesional a ratones BALB/c infectados con *Nocardia brasiliensis*, evaluando posteriormente sus efectos a nivel clínico, histopatológico y en poblaciones de linfocitos T.

**Conclusiones y contribución:** Este estudio reveló que las nanopartículas bimetalicas de  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ ,  $\text{TiO}_2\text{-V}$  y  $\text{TiO}_2\text{Gd}$  presentan un significativo efecto antimicrobiano contra *Nocardia brasiliensis*, *in vitro*. Además, las Np de  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$  demostraron tener baja citotoxicidad en esplenocitos. También, se observaron cambios en las subpoblaciones de linfocitos T de ratones infectados con *N. brasiliensis* tratados con  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ , identificando una disminución significativa en las células T CD8+ y un aumento significativo en las células T CD4+ a nivel local, sugiriendo un posible efecto inmunomodulador. Estos hallazgos demuestran el potencial de las nanopartículas bimetalicas con capacidad microbicida e inmunomoduladora, siendo entonces una alternativa terapéutica eficaz y segura para el tratamiento del actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*, y generando una nueva vía de investigación y posible aplicación clínica frente a la resistencia a antibióticos.

**FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS**



---

Dr. C. Mario César Salinas Carmona  
Director de Tesis

# TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
1.1. Generalidades del micetoma .....	1
1.2. Patogénesis .....	1
1.3. Distribución geográfica y epidemiología .....	3
1.4. Taxonomía de <i>Nocardia brasiliensis</i> .....	6
1.5. Histopatología del actinomicetoma .....	7
1.6. Modelo experimental de actinomicetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i> .....	8
1.7. Tratamiento.....	10
1.8. Uso de nanopartículas metálicas como alternativas terapéuticas .....	13
1.9. Antecedentes .....	15
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>18</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
4.1. Objetivo General.....	19
4.2. Objetivos específicos.....	19
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
5.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas bimetálicas TiO <sub>2</sub> -Ag, TiO <sub>2</sub> -V y TiO <sub>2</sub> -Gd para <i>Nocardia brasiliensis</i> .....	20
5.1.1. Cepas bacterianas .....	20
5.1.2. Preparación de la suspensión unicelular de <i>N. brasiliensis</i> .....	20
5.1.3. Ajuste de las suspensiones bacterianas .....	21



5.1.4.	Preparación de soluciones stock .....	21
5.1.5.	Microdiluciones seriadas en placa.....	21
5.1.6.	Determinación de concentración mínima letal (CML) .....	22
<b>5.2.</b>	<b>Evaluación del efecto citotóxico de las nanopartículas bimetálicas TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd sobre esplenocitos de ratón BALB/c .....</b>	<b>23</b>
5.2.1.	Extracción de Bazo .....	23
5.2.2.	Preparación de suspensión de esplenocitos .....	24
5.2.3.	Ensayo de citotoxicidad.....	25
<b>5.3.</b>	<b>Evaluación del efecto de las nanopartículas bimetálicas TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd sobre el actinomicetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i>.....</b>	<b>26</b>
5.3.1.	Cepas de ratones BALB/c.....	26
5.3.2.	Modelo de infección experimental .....	26
5.3.3.	Aplicación del tratamiento.....	27
5.3.4.	Monitorización de los ratones.....	28
5.3.5.	Obtención de células de bazo .....	29
5.3.6.	Obtención de células de cojinete plantar .....	29
5.3.7.	Citometría de flujo .....	30
5.3.8.	Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC) .....	32
5.3.9.	Evaluación histopatológica .....	33
<b>5.4.</b>	<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>34</b>
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>6.1.</b>	<b>Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas bimetálicas TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd para <i>Nocardia brasiliensis</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>6.2.</b>	<b>Evaluación del efecto citotóxico de las nanopartículas bimetálicas TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd sobre esplenocitos de ratón BALB/c .....</b>	<b>37</b>

6.3.	Evaluación del efecto de las nanopartículas bimetálicas TiO <sub>2</sub> -Ag, TiO <sub>2</sub> -V y TiO <sub>2</sub> -Gd sobre el actinomicetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i> .....	49
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>59</b>
7.1.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas bimetálicas TiO <sub>2</sub> -Ag, TiO <sub>2</sub> -V y TiO <sub>2</sub> -Gd para <i>Nocardia brasiliensis</i> .....	59
7.2.	Evaluación del efecto citotóxico de las nanopartículas bimetálicas TiO <sub>2</sub> -Ag, TiO <sub>2</sub> -V y TiO <sub>2</sub> -Gd sobre esplenocitos de ratón BALB/c .....	61
7.3.	Evaluación del efecto de las nanopartículas bimetálicas TiO <sub>2</sub> -Ag, TiO <sub>2</sub> -V y TiO <sub>2</sub> -Gd sobre el actinomicetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i> .....	63
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>68</b>
<b>9.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>70</b>

## LISTA DE TABLAS

TABLA I. ESTRATEGIAS PARA EL TRATAMIENTO DEL ACTINOMICETOMA.....	10
TABLA II. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS.....	16
TABLA III. ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA INMUNOFENOTIPIFICACIÓN.....	31
TABLA IV. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA LETAL DE LAS NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS $TiO_2$ -AG, $TiO_2$ -V Y $TiO_2$ -GD PARA <i>STAPHYLOCOCCUS</i> <i>AUREUS</i> .....	35
TABLA V. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA LETAL DE LAS NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS $TiO_2$ -AG, $TiO_2$ -V Y $TiO_2$ -GD PARA <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	36
TABLA VI. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA LETAL DE LAS NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS $TiO_2$ -AG, $TiO_2$ -V Y $TiO_2$ -GD PARA <i>NOCARDIA BRASILIENSIS</i> .....	37

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN GLOBAL DEL MICETOMA. ....	4
FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN DEL MICETOMA EN MÉXICO. ....	5
FIGURA 3 DESARROLLO HISTOPATOLÓGICO DEL MICETOMA. ....	8
FIGURA 4. ESCALA DE EVALUCION CLÍNICA DEL ACTINOMICETOMA POR <i>N. BRASILIENSIS</i> EN EL MODELO EXPERIMENTAL.....	28
FIGURA 5. VIABILIDAD CELULAR DE ESPLENOCITOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TiO <sub>2</sub> - AG (2) DURANTE UNA HORA. ....	38
FIGURA 6. VIABILIDAD CELULAR DE ESPLENOCITOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TiO <sub>2</sub> - AG (2) DURANTE TRES HORAS. ....	40
FIGURA 7. VIABILIDAD CELULAR DE ESPLENOCITOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TiO <sub>2</sub> - V DURANTE UNA HORA. ....	42
FIGURA 8. VIABILIDAD CELULAR DE ESPLENOCITOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TiO <sub>2</sub> - V DURANTE TRES HORAS. ....	44
FIGURA 9. VIABILIDAD CELULAR DE ESPLENOCITOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TiO <sub>2</sub> - Gd DURANTE UNA HORA.....	46
FIGURA 10. VIABILIDAD CELULAR DE ESPLENOCITOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TiO <sub>2</sub> -Gd DURANTE TRES HORAS.....	48
FIGURA 11. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DEL ACTINOMICETOMA POR <i>N. BRASILIENSIS</i> ENTRE EL GRUPO TRATADO CON TiO <sub>2</sub> -AG (2) Y EL GRUPO CONTROL. ....	50
FIGURA 12. COMPARACIÓN DEL VOLUMEN DEL ACTINOMICETOMA POR <i>N. BRASILIENSIS</i> ENTRE GRUPOS. ....	51
FIGURA 13. MICROSCOPIA DEL ACTINOMICETOMA POR <i>NOCARDIA BRASILIENSIS</i> DEL GRUPO CONTROL.....	52
FIGURA 14. MICROSCOPIA DEL ACTINOMICETOMA POR <i>NOCARDIA BRASILIENSIS</i> DEL GRUPO TRATADO CON NP DE TiO <sub>2</sub> -AG (2). ....	53
FIGURA 15. EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE TiO <sub>2</sub> -AG (2) EN LA DISTRIBUCIÓN DE LINFOCITOS T CD4+ Y CD8+ A NIVEL LOCAL. ....	54

FIGURA 16. ALTERACIONES EN LAS POBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4+ Y CD8+ EN EL BAZO DE RATONES BALB/C TRAS TRATAMIENTO CON NANOPARTÍCULAS DE TiO <sub>2</sub> -Ag (2).....	56
FIGURA 17. EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE TiO <sub>2</sub> -Ag (2) EN LA REDUCCIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DE <i>NOCARDIA BRASILIENSIS</i> . ....	58

## ABREVIATURAS

<b>APC</b>	Alofococianina
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BHI</b>	Infusión cerebro corazón
<b>CLSI</b>	Instituto de normas clínicas y de laboratorio
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>CML</b>	Concentración Mínima Letal
<b>Ctrl</b>	Control
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado de Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>FSC</b>	Detector frontal
<b>Gd</b>	Gadolinio
<b>MAb</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>MH</b>	Caldo Müller-Hinton
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Cloruro de amonio
<b>NK</b>	Células asesinas naturales
<b><i>N.b.</i></b>	<i>Nocardia brasiliensis</i>
<b>Np</b>	Nanopartículas
<b>OD</b>	Densidad óptica
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>PMN</b>	Células polimorfonucleares
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SBF</b>	Suero bovino fetal
<b>SSC</b>	Detector lateral
<b>Ti</b>	Titanio
<b>TiO<sub>2</sub></b>	Dioxido de titanio
<b>TMP-SMX</b>	Trimetropin con sulfametoxazol
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>V</b>	Vanadio

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCION

### 1.1. Generalidades del micetoma

El micetoma es una enfermedad caracterizada por inflamación crónica que afecta a diversos tejidos, como la piel, los tejidos celulares subcutáneos y, en ocasiones, incluso los huesos y las vísceras [1]. Esta enfermedad se manifiesta con la formación de una tumoración y deformidad de la zona afectada, acompañadas de fístulas que drenan un exudado seropurulento. Dentro de este exudado, el agente causal se encuentra formando "granos" o microcolonias, siendo esta, una característica distintiva de la enfermedad [2].

La presentación clínica del micetoma varía en función de la naturaleza del patógeno y de la respuesta inmunitaria del individuo. La enfermedad suele progresar lentamente, pero si no se trata puede provocar morbilidad grave. La naturaleza crónica del micetoma, unida a su potencial para causar importantes daños tisulares, lo convierte en un problema importante de salud pública, sobre todo en regiones con infraestructura limitada y falta de acceso a servicios de salud de calidad [3].

### 1.2. Patogénesis

El micetoma es una enfermedad causada por la inoculación traumática exógena de hongos o actinomicetos [4], lo que resulta en dos variantes principales: el actinomicetoma (originado por bacterias) y el eumicetoma (causado por hongos). Los agentes patógenos asociados al micetoma suelen hallarse en el

suelo y en la vegetación. Esto implica que los agricultores y aquellos individuos cuyas ocupaciones involucran trabajar descalzos al aire libre, se encuentran en un riesgo elevado de contraer la enfermedad infecciosa [3], [5].

El pronóstico de la infección está condicionado por diversos factores, incluyendo el tipo de microorganismo responsable, la localización de la infección en el organismo y las características propias del paciente, que engloban tanto su respuesta inmunológica, como su estado hormonal y comorbilidades [1]. Las áreas del cuerpo más propensas a ser afectadas son las extremidades inferiores, con un 70% de los casos presentando afectación en los pies, seguido por las manos y la espalda [6].

El inicio clínico de la enfermedad se caracteriza por la aparición de una pápula pequeña y asintomática, localizada en la planta o dorso del pie. Esta lesión experimenta un crecimiento progresivo en tamaño y, con el tiempo, la integridad cutánea se ve comprometida, dando lugar a la formación de nódulos, abscesos y tractos fistulosos en el tejido afectado. Dichas lesiones tienden a diseminarse hacia regiones adyacentes, y mientras se desarrollan nuevas manifestaciones clínicas, las lesiones preexistentes experimentan un proceso de resolución, dejando como secuela cicatrices en los sitios afectados [6]. En la mayoría de las instancias, la afectación ósea se manifiesta en las fases avanzadas de la enfermedad, particularmente en lesiones que han persistido durante varios años. No obstante, en ciertos casos, esta complicación puede surgir en un periodo de tiempo relativamente corto [7] .

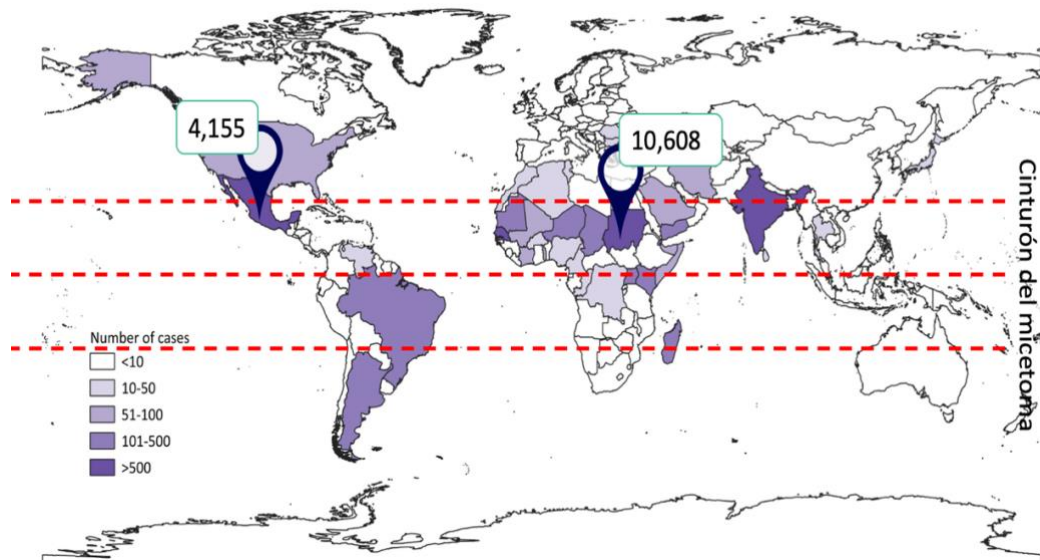
Aproximadamente 45 especies son responsables de causar micetoma. El eumicetoma es provocado por hongos filamentosos, septados, que pueden



presentar pigmentación oscura o ser incoloros. Entre las especies más destacadas se encuentran *Madurella* y *Pseudallescheria*, siendo estas las más comúnmente aisladas en casos de eumicetoma. En cuanto a los actinomicetomas, los principales agentes etiológicos son *Nocardia brasiliensis* (N.b), *N. asteroides*, *Actinomadura madurae*, *A. pelletrieri* y *Streptomyces somaliensis* ( Welsh et al., 2007).

### **1.3. Distribución geográfica y epidemiología**

Desde el 2016, el micetoma es clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad tropical desatendida [1]. Esta se distribuye a nivel mundial, pero se encuentra más comúnmente dentro del "cinturón de micetoma" [9]. Esta área abarca regiones de África, India y América Central y del Sur. La prevalencia de esta enfermedad está estrechamente relacionada con las condiciones socioeconómicas y afecta predominantemente a las comunidades rurales empobrecidas con acceso limitado a la atención médica [10].

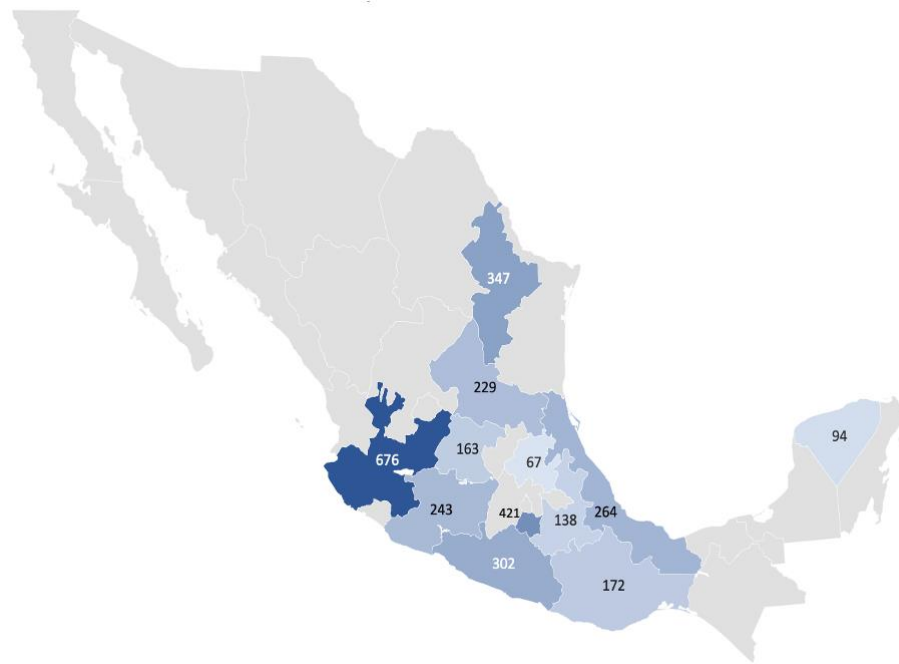


**Figura 1. Distribución Global del Micetoma.**

La presente figura muestra la distribución y ubicación de los casos de micetoma. Entre las latitudes de 15° sur y 30° norte, el cinturón del micetoma se extiende desde el Trópico de Cáncer hasta el Trópico de Capricornio. México presenta el mayor número de casos en América Latina. [Imagen modificada de Emery & Denning, 2020]

El alcance geográfico del micetoma se extiende más allá de sus zonas endémicas tradicionales en los trópicos. Han surgido informes de casos de todos los continentes, excepto la Antártida, lo que sugiere una distribución más extensa que la reconocida anteriormente, como se observa en la figura 1. Interesantemente, la enfermedad se ha identificado mucho más allá de sus típicos hábitats tropicales, con casos informados en países como Estados Unidos, Venezuela, Italia, China y Australia [11]. Este alcance ampliado puede atribuirse a los efectos del aumento de la globalización y el cambio climático, lo que podría facilitar la propagación del micetoma desde sus regiones endémicas [10].

En México, el micetoma se ha identificado en el 75% de los estados del país como se puede observar en la figura 2. A través de un estudio epidemiológico en nuestra nación, con el objetivo de establecer la tasa de incidencia del micetoma, se recopiló una serie de datos correspondientes a un total de 2,015 casos de micetoma a lo largo de tres décadas, arrojando una media de 73 casos por año.



**Figura 2. Distribución del Micetoma en México.**

La presente figura muestra la distribución de casos de micetoma en México. Los estados que registran la mayor cantidad de casos son Jalisco con 676, Morelos con 421, Nuevo León con 347, Guerrero con 302 y Veracruz con 264.

La enfermedad afecta predominantemente a las personas que se dedican a la agricultura, con el 58.41% de los casos, seguida de las amas de casa con el 21.79%. Los hombres se ven afectados con mayor frecuencia que las mujeres,

con un 75.6 % de los casos notificados en hombres. La mayoría de los casos, el 75.72%, se dan en adultos de entre 16 y 50 años de edad [5].

El actinomicetoma, predominantemente causado por *Nocardia brasiliensis*, es la forma de micetoma más prevalente en México, representando el 96.52% de los casos. El eumicetoma, causado principalmente por *Madurella grisea* solamente representa el 3.48% restante de los casos.

#### **1.4. Taxonomía de *Nocardia brasiliensis***

Los organismos del género *Nocardia* son actinomicetos aerobios clasificados dentro del orden *Actinomycetales*. Se han identificado más de 30 especies dentro de este género, y actualmente solo 11 de ellas son reconocidas como válidas. Aunque contienen ácidos micólicos de 46 a 60 carbonos en su estructura, se diferencian de las micobacterias debido a la longitud más corta de estas cadenas de ácidos micólicos [12]. Morfológicamente, se presentan como bacilos Gram positivos ramificados, cuyas extensas hifas pueden fragmentarse en formas cocobacilares. Estos microorganismos tienen una distribución global y exhiben una naturaleza saprofítica, lo que los establece como componentes de la microflora típica del suelo. En condiciones óptimas de crecimiento a 37°C en medios convencionales como el agar Sabouraud, forman colonias de aspecto rocoso y seco que varía en color desde el blanco hasta el anaranjado [13].

*Nocardia brasiliensis* es una bacteria Gram positiva que muestra resistencia parcial a la decoloración por ácido-alcohol. Es un microorganismo facultativamente intracelular, de morfología filamentosa e inmóvil. Además, se caracteriza por su naturaleza saprofítica y su crecimiento lento en condiciones aerobias [14]. La estructura de la pared celular de esta bacteria desempeña un

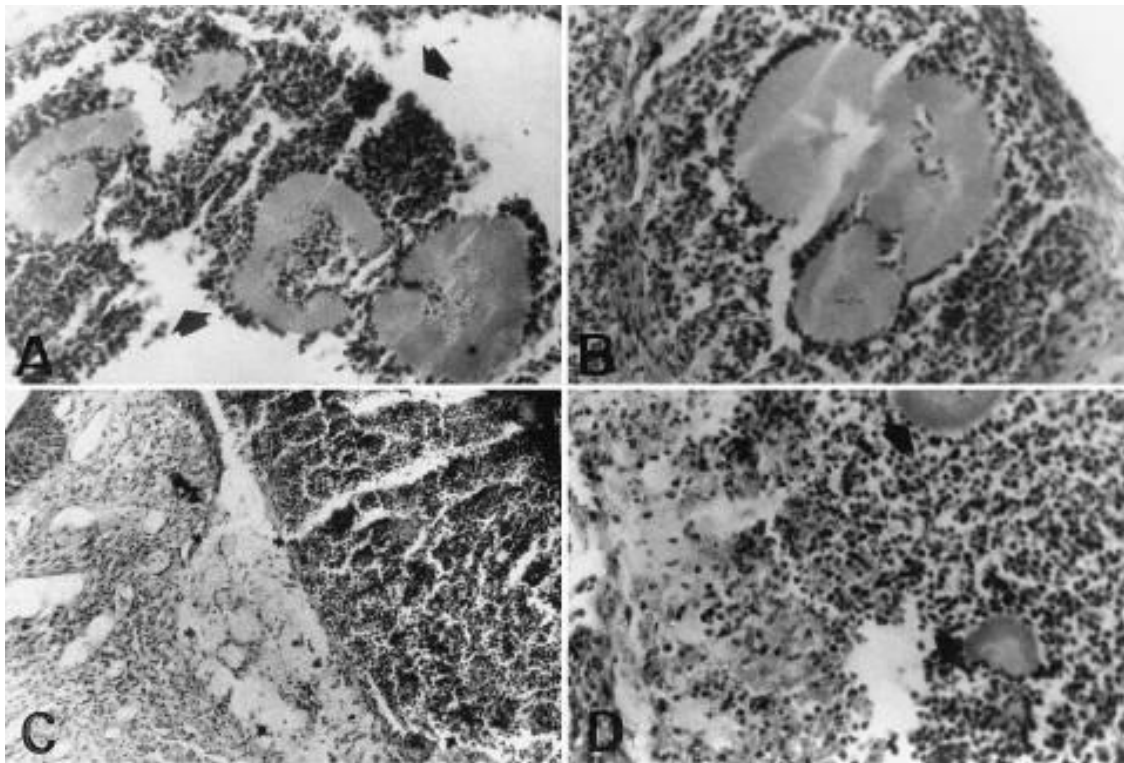
papel crucial, no solo protegiendo al microorganismo de las condiciones adversas del entorno, sino también iniciando respuestas inflamatorias en el hospedero. Además, esta barrera contribuye significativamente a la prolongación de la duración de las infecciones y fortalece la resistencia del patógeno frente a una amplia gama de antibióticos, lo cual, en conjunto, favorece la extensión de su viabilidad [13].

### **1.5. Histopatología del actinomicetoma**

Histopatológicamente, el actinomicetoma se caracteriza por la formación de granulomas y abscesos en la dermis y el tejido subcutáneo. En el contexto de una infección humana por *N. b*, se observa una intensa reacción inflamatoria granulomatosa en el sitio de la lesión, acompañada de la formación de abscesos que contienen gránulos del microorganismo infeccioso. Estos gránulos están compuestos por conglomerados de filamentos intracelulares, y están rodeados por una abundante presencia de células polimorfonucleares (PMN) y células mononucleares, incluyendo linfocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y células espumosas. Todo este conjunto está delimitado por una zona periférica de fibroblastos y colágeno. Estos hallazgos histopatológicos son esenciales para el diagnóstico definitivo de la enfermedad [1].

En el modelo murino de actinomicetoma por *N. brasiliensis*, las lesiones en etapas agudas muestran una prominente infiltración de neutrófilos, inflamación, formación de microabscesos alrededor de los gránulos bacterianos y destrucción del tejido circundante [15]. A medida que la enfermedad evoluciona hacia una fase crónica, se mantiene la presencia del infiltrado inflamatorio agudo, y comienzan a formarse granulomas fibrosos, compuestos por

macrófagos, células gigantes multinucleadas, células espumosas, linfocitos y células plasmáticas, todos ellos rodeados por una cápsula de tejido fibroso y colágena (Figura 3.). Estos resultados demuestran que los ratones BALB/c infectados reproducen de manera muy similar las características histológicas de la enfermedad tal como se desarrolla en los seres humanos [13].



**Figura 3. Desarrollo Histopatológico del Micetoma.**

En la presente figura se muestran varios microabscesos de secciones embebidas en parafina, teñidas con hematoxilina y eosina (A; aumento, x40). A los 10 días, se observan macrófagos espumosos que limitan el absceso (B), así como células polimorfonucleares y mononucleares, junto con macrófagos gigantes espumosos (C; aumento, x40). Además, se aprecia una microcolonia de *N. brasiliensis* 90 días después de la infección (D). [Imagen tomada de Salinas-Carmona, 2000].

#### **1.6. Modelo experimental de actinomietoma por *Nocardia brasiliensis***

En 1999, Salinas Carmona y su equipo [16] implementaron un modelo experimental de actinomicetoma en ratones BALB/c, induciendo la infección en el cojinete plantar mediante la inoculación de *N. brasiliensis*. En las fases iniciales de las manifestaciones clínicas en el modelo, se observó una respuesta inflamatoria aguda en el sitio de inoculación, alcanzando su máxima expresión aproximadamente una semana después de la inoculación, para luego experimentar una reducción en el volumen de la inflamación, la cual se resolvió alrededor del día 15. Posteriormente, a partir del día 30, se evidenció un incremento significativo en la inflamación, estableciéndose así la fase crónica de la infección. A medida que la infección avanzaba, se registró un aumento en el tamaño de la lesión, lo que eventualmente condujo a la deformación tisular, la formación de fístulas y la secreción de gránulos. De acuerdo con las observaciones realizadas en este modelo experimental, se definió que la fase aguda de la infección comprende desde el primer día hasta el día 15, mientras que la fase crónica se inicia a partir del día 30 post-inoculación. Lo anterior demostró que el modelo animal era capaz de semejar la fisiopatología observada en los pacientes con actinomicetoma.

Previamente, Welsh y colaboradores llevaron a cabo un estudio en el que indujeron micetomas experimentales en ratas mediante la inoculación de *N. brasiliensis* [17]. A pesar de que las ratas manifestaron lesiones características de la infección, se observó un fenómeno de resolución espontánea de las mismas alrededor del vigésimo día post-inoculación, y esto ocurrió en ausencia de cualquier intervención terapéutica. Este patrón de resolución contrasta

marcadamente con el observado en ratones, en los cuales la infección por *N. brasiliensis* tiene el potencial de progresar hacia una condición crónica.

### 1.7. Tratamiento

El tratamiento de los actinomicetomas, en particular los causados por *Nocardia brasiliensis*, es un proceso complejo y prolongado que requiere una identificación precisa del agente etiológico y un conocimiento exhaustivo del estado de salud general del paciente [18]. El régimen de tratamiento primario, conocido como régimen Welch (Tabla I), es una combinación de dapsona (100 a 200 mg una vez al día) y trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) (80/400 a 160/800 mg una vez al día) administrada durante 2 a 3 años. Este régimen ha demostrado ser eficaz en el tratamiento del actinomicetoma sin afectación ósea [2].

**Tabla I. Estrategias para el Tratamiento del Actinomicetoma**

<b>Regimen</b>	<b>Fase intensiva</b>		<b>Fase de mantenimiento</b>	
<b>Régimen Welsh</b>	Amikacina Trimetoprim-sulfametoxazol días. *	+ 21	Trimetoprim-sulfametoxazol continuando durante 2 semanas después del último ciclo.	
<b>Régimen Welsh modificado</b>	Amikacina Trimetoprim-sulfametoxazol Rifampicina durante días. *	+ + 21	Trimetoprim-sulfametoxazol rifampicina durante meses.	+ 3



<b>Régimen de dos pasos</b>	Penicilina + Trimetoprim-sulfametoxazol durante 5-7 semanas.		Cotrimoxazol + Amoxicilina, durante 2-5 meses
<b>Régimen de dos pasos modificado</b>	Gentamicina + Cotrimoxazol durante 4 semanas.		Doxiciclina y Cotrimoxazol, hasta 5-6 meses

\* 1-3 ciclos con intervalos de 15 días entre cada ciclo.

Sin embargo, en los casos en que el régimen de Welch no es eficaz o el paciente es resistente al tratamiento, pueden considerarse antibióticos alternativos [19]. Entre ellos se encuentran la amikacina, la kanamicina, la fosfomicina, la estreptomina y la rifampicina. La amikacina, por ejemplo, se administra por vía intramuscular a una dosis de 15 mg/kg o 500 mg dos veces al día durante 3 semanas en combinación con dapsona y TMP-SMX. Sin embargo, este antibiótico se reserva para los casos resistentes debido a sus potenciales efectos nefrotóxicos y ototóxicos [20].

Otra alternativa es la kanamicina, administrada por vía intramuscular a una dosis de 15 mg/kg una vez al día durante 2 semanas al inicio del tratamiento, alternando con periodos de descanso para reducir el riesgo de nefrotoxicidad y ototoxicidad. Otros regímenes incluyen dapsona más fosfomicina, dapsona más estreptomina y TMP-SMX o rifampicina más estreptomina.

En un estudio se evaluó la susceptibilidad *in vitro* de 30 cepas de *Nocardia brasiliensis* a una amplia variedad de agentes antimicrobianos. Los resultados revelaron que más un tercio de las cepas mostraron sensibilidad a la

amoxicilina-ácido clavulánico, amikacina, espiramicina, gentamicina, isepamicina, linezolid, minociclina, netilmicina, nitroxolina, piperacilina-tazobactam y tobramicina [21].

En los últimos años se han utilizado carbapenemicos como el imipenem y el meropenem por su actividad de amplio espectro y su resistencia a las  $\beta$ -lactamasas [22], [23]. Se recomiendan especialmente para los casos con afectación ósea. Para los casos resistentes asociados a especies de *Nocardia*, se ha sugerido una combinación de clindamicina y quinolonas (ciprofloxacino, moxifloxacino y garenoxacino) [18].

Es importante señalar que la tasa de curación del actinomicetoma tratado con cualquiera de las terapias mencionadas oscila entre el 60% y el 90% [24]. El tratamiento debe modificarse o interrumpirse si existen pruebas clínicas o de laboratorio de toxicidad farmacológica. El tratamiento quirúrgico del actinomicetoma suele estar contraindicado debido a la posibilidad de diseminación hematógena. Una vez finalizado el protocolo de tratamiento inicial, la mayoría de los expertos recomiendan continuar el tratamiento con dapsona durante varios años para prevenir la recurrencia [25].

Aunque los protocolos terapéuticos vigentes para el actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* han demostrado ser efectivos, se han identificado casos de resistencia a antibióticos específicos, como el co-trimazol [26], que han resultado en formas diseminadas de la enfermedad [27]. Además, el costo asociado al tratamiento es considerablemente alto, con estimaciones que pueden alcanzar los 560 dólares anuales [28]. Este aspecto económico es

particularmente relevante, ya que la patología afecta principalmente a comunidades en situación de pobreza, lo que plantea un desafío adicional en términos de accesibilidad del tratamiento [29].

### **1.8. Uso de nanopartículas metálicas como alternativas terapéuticas**

Las nanopartículas (Np) metálicas se caracterizan por sus dimensiones en la escala nanométrica, exhibiendo al menos una dimensión inferior a los 100 nm [30]. Estas pueden presentar configuraciones metálicas, semiconductoras, poliméricas y basadas en carbono. Los nanomateriales metálicos, tales como la plata, el oro, el cobre y el titanio, resultan de interés debido a sus propiedades fisicoquímicas, las cuales se traducen en una actividad antibacteriana significativa [31]. Dentro de esta categoría, las nanopartículas de plata se distinguen por su amplia investigación y aplicación, manifestando propiedades electrónicas, ópticas y químicas distintivas, y adoptando diversas morfologías como esferas, varillas, láminas, hojas y nanoprismas. La eficacia antibacteriana de estas nanopartículas está intrínsecamente relacionada con su tamaño y recubrimiento superficial, siendo las partículas de menor tamaño las que exhiben una toxicidad más elevada, lo que resalta la importancia de un control riguroso en los procesos de síntesis de nanopartículas.

Las propiedades antibacterianas de los nanomateriales metálicos se deben a su capacidad para interactuar con las células bacterianas, induciendo la absorción celular, la agregación de nanopartículas, la alteración de la membrana celular y, finalmente, la citotoxicidad [32]. Las nanopartículas de plata (Ag), en particular, demuestran su potencial antibacteriano al perturbar la funcionalidad de la membrana y al inducir estrés oxidativo a través de la generación de especies

reactivas de oxígeno (ROS). Los iones  $\text{Ag}^+$  liberados por esta Nps se unen a los grupos -tiol de las proteínas y enzimas presentes en la superficie celular, provocando la desestabilización de la membrana celular y la interrupción de la síntesis de ATP [33], [34]. Además, pueden adherirse a la pared de la membrana, creando poros que facilitan su penetración en la célula, donde pueden interactuar con componentes intracelulares.

En contraste con los antibióticos convencionales, que son susceptibles a mecanismos de resistencia bacteriana las nanopartículas metálicas presentan un mecanismo de acción de naturaleza física, con el potencial de eludir las contramedidas adaptativas implementadas por las bacterias [35].

No únicamente se ha documentado un efecto antimicrobiano atribuible a las nanopartículas metálicas, sino que también se ha identificado un potencial efecto inmunomodulador, tal como se observa en el caso de las nanopartículas de dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ). Estas últimas se caracterizan por su estabilidad, propiedades anticorrosivas, reactividad superficial y capacidad fotocatalítica [36]. Dichas características ejercen un impacto considerable tanto en la funcionalidad del sistema inmunológico como en la viabilidad celular [37]. La exposición a estas nanopartículas puede desencadenar la activación sistémica de los linfocitos T, inducir la producción de citocinas proinflamatorias por parte de los linfocitos T y provocar la muerte de los linfocitos T [38].

De manera más específica, la administración *in vivo* de estas nanopartículas se traduce en una amplia gama de efectos inmunomoduladores. En un estudio [39] se demostró que la administración intratraqueal bisemanal de dosis que oscilan entre 0.5 y 32 mg/kg de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  a ratas de la cepa Sprague-

Dawley resultó en un incremento de la celularidad en el bazo, así como en la acumulación de partículas en los ganglios linfáticos cervicales. Este fenómeno muestra que las nanopartículas tienden a concentrarse en los órganos linfoides periféricos, demostrando su capacidad para modular el sistema inmunológico a nivel sistémico. La respuesta del sistema inmunológico se caracterizó por un aumento en la proliferación de linfocitos T y B después de la estimulación, y una mayor actividad lítica por parte de las células asesinas naturales (NK) en el bazo, acompañada por un mayor número de células B en la sangre periférica.

### **1.9. Antecedentes**

Si bien hasta la fecha no se han utilizado Np para tratar infecciones por *Nocardia brasiliensis* existe evidencia de su utilidad en modelos experimentales de infección por *Mycobacterium tuberculosis* [40], esto resulta relevante ya que ambas bacterias comparten características patogénicas y están estrechamente relacionadas filogénicamente [41]. La literatura muestra que las Np de plata y óxido de zinc con dimensiones inferiores a 20 nm pueden penetrar directamente a través de la membrana celular de los macrófagos y aumenta permeabilidad de la membrana de *Mycobacterium tuberculosis* lo que lleva a la formación poros de tamaño nanométrico y liberando contenido intracelular [42].

En el ámbito de la nanotecnología, las nanopartículas bimetálicas, son definidas como nanopartículas compuestas por dos elementos metálicos diferentes [43]. Estas poseen una capacidad antimicrobiana superior en comparación con sus homólogas monometálicas [44]. Este fenómeno se manifiesta claramente en el caso de las nanopartículas compuestas por titanio (Ti) y vanadio (V), donde se constató un efecto antimicrobiano significativamente potente contra *E. coli*,

específicamente cuando se presentaban en una proporción de 50Ti - 50V, en contraste con los resultados obtenidos cuando estos elementos se utilizaban de manera independiente [45]. Otro caso similar lo tenemos en el uso de Np de Ti y gadolinio (Gd) en donde se demostró un significativo efecto antimicrobiano contra cepas de *S. aureus* tanto sensibles como resistentes a meticilina en un rango de concentraciones desde 45 µg/ml hasta 125 µg/mL [46].

Previamente, Bretado y colaboradores, llevaron a cabo la síntesis y caracterización de una serie de nanopartículas bimetálicas, tal como se muestra en la Tabla II. Estas nanopartículas han demostrado tener propiedades antimicrobianas efectivas frente a diversas cepas bacterianas, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Serratia marcescens*.

**Tabla II. Caracterización Física de Nanopartículas Bimetálicas.**

<b>Nanopartícula</b>	<b>Diámetro hidrodinámico</b>	<b>Índice de polidispersidad</b>
<b>TiO<sub>2</sub>- Ag (1)</b>	71.60 nm	0.378
<b>TiO<sub>2</sub>- Ag (2)</b>	26.90 nm	0.306
<b>TiO<sub>2</sub>- V</b>	48.37 nm	0.508
<b>TiO<sub>2</sub>- Gd</b>	33.81 nm	0.325

El presente trabajo se centrará en el estudio de estas nanopartículas bimetálicas.

## CAPÍTULO II

### JUSTIFICACIÓN

El actinomicetoma causado por *Nocardia brasiliensis* es una enfermedad desatendida y debilitante con un impacto significativo en la salud pública en áreas empobrecidas y rurales. A pesar de su presencia global, sigue siendo poco estudiado y financiado, lo que ha llevado a tratamientos inadecuados. Las opciones terapéuticas actuales son costosas y están asociadas a efectos secundarios adversos. Además, la larga duración del tratamiento, a menudo de varios meses, da como resultado fallas en el apego terapéutico por parte del paciente. Esta situación se agrava con la aparición de cepas de *N. brasiliensis* resistentes a antibióticos, lo que destaca la urgente necesidad de soluciones innovadoras y más accesibles.

La exploración de nanomateriales, en particular las nanopartículas bimetálicas, ofrece una vía prometedora para mejorar el tratamiento debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas y a sus potenciales efectos antibacterianos. Sin embargo, la aplicación de estas nanopartículas en el tratamiento del actinomicetoma permanece en gran medida inexplorada y requiere una investigación exhaustiva.

El ensayo de nanomateriales en modelos *in vitro* e *in vivo* de actinomicetoma es un paso fundamental para comprender su potencial como agentes terapéuticos.

## CAPÍTULO III

### HIPÓTESIS

*Nocardia brasiliensis* es susceptible *in vitro* e *in vivo* a las nanopartículas bimetálicas TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd.



# CAPÍTULO IV

## OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de las nanopartículas bimetálicas  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ ,  $\text{TiO}_2\text{-V}$  y  $\text{TiO}_2\text{-Gd}$  en el actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*.

### 4.2. Objetivos específicos

1. Determinar la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas bimetálicas  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ ,  $\text{TiO}_2\text{-V}$  y  $\text{TiO}_2\text{-Gd}$  para *Nocardia brasiliensis*
2. Evaluar el efecto citotóxico de las nanopartículas bimetálicas  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ ,  $\text{TiO}_2\text{-V}$  y  $\text{TiO}_2\text{-Gd}$  sobre esplenocitos de ratón BALB/c
3. Evaluar el efecto de las nanopartículas bimetálicas  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ ,  $\text{TiO}_2\text{-V}$  y  $\text{TiO}_2\text{-Gd}$  sobre el actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*

# CAPÍTULO V

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas bimetálicas TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd para *Nocardia brasiliensis*

#### 5.1.1. Cepas bacterianas

La cepa de *Nocardia brasiliensis* utilizada en este proyecto fue *N. brasiliensis* HUJEG-1 (ATCC 700358). Esta cepa fue cultivada en caldo BHI (Brain Heart Infusion) y posteriormente incubada a 37 °C con agitación continua durante un período de 72 horas. Así mismo, se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). Estas últimas fueron sembradas en placas de agar nutritivo y se incubaron a 37 °C por 24 horas, Una vez que las cepas de *E. coli* y *S. aureus* llegaron a fase logarítmica (18-24 horas de crecimiento), se preparó una suspensión bacteriana en 1ml de solución salina (NaCl) al 0.9% estéril.

#### 5.1.2. Preparación de la suspensión unicelular de *N. brasiliensis*

A partir de la cepa de *N.brasiliensis* previamente descrita, se añadió una alícuota de 1.5 ml a una concentración de  $1.5 \times 10^6$  UFC/ml en un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 100 ml de caldo BHI previamente esterilizado. Tras la adición, los matraces se incubaron a 37 °C durante un periodo de 72 horas en agitación continua. Posteriormente, la biomasa bacteriana se extrajo del matraz y se transfirió a tubos cónicos de 50 ml, donde

se centrifugó a 3,500 rpm durante 10 minutos. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el pellet bacteriano se lavó con 50 ml de solución salina estéril, repitiendo el proceso de centrifugación y lavado en dos ocasiones adicionales. Finalmente, las bacterias se homogenizaron utilizando un tubo Potter-Evelham, resultando en una suspensión unicelular. Este procedimiento se realizó en estrictas condiciones de esterilidad.

### **5.1.3. Ajuste de las suspensiones bacterianas**

Las suspensiones bacterianas previamente mencionadas se ajustaron espectrofotométricamente a una densidad óptica (OD) a 600 nm entre 0.08-0.12, equivalentes a  $1-2 \times 10^8$  UFC/ml. Para *N. brasiliensis* se realizó una dilución 1:30, mientras que para *E. coli* y *S. aureus* se efectuó una dilución 1:20, utilizando para ello caldo Müller-Hinton (MH) ajustado en cationes.

### **5.1.4. Preparación de soluciones stock**

Para la elaboración del stock de las muestras se pesaron 1mg de cada una de las Np de TiO<sub>2</sub>-Ag (1), TiO<sub>2</sub>-Ag (2), TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd y se disolvieron en 10 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) al 1% en tubos cónicos de 15 ml. Las muestras se agitaron con ayuda de un vórtex hasta su completa disolución y se almacenaron en oscuridad hasta su posterior uso.

### **5.1.5. Microdiluciones seriadas en placa**

Para obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las Np se utilizó la técnica de microdilución en placa de 96 pozos de acuerdo con las instrucciones recomendadas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [47]. Utilizando las soluciones stock de Np se realizaron diluciones seriadas con caldo Müller-Hinton ajustado en cationes, de forma que las concentraciones finales

fueran 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5 y 0.250 ppm, esto para cada una de las nanopartículas estudiadas. El antibiótico amikacina fue utilizado como control en las concentraciones de 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 y 0.5 µg/ml.

Tras homogenizar las diluciones con ayuda de un vórtex, se agregó 20 µl de cada concentración en la microplaca junto con 70 µl de MH y 10 µl de la dilución bacteriana. Igualmente se colocaron 100 µl de caldo MH en un pozo como control negativo y como control positivo se colocaron 10 µl de la dilución bacteriana y 90 µl de caldo MH. Las placas para las CMI se realizaron por triplicado y se repite por duplicado por cada Np por lo que se utilizaron dos filas por cada una. Las placas con *N.b.* se incubaron a 37 °C por 5 días, mientras que las placas de *S. aureus* y *E. coli* se incubaron a 37 °C por 24 horas, posterior a este periodo placa se examinó para determinar la concentración mínima inhibitoria, definida como aquella en la que no se observaba crecimiento bacteriano en el pozo.

#### **5.1.6. Determinación de concentración mínima letal (CML)**

Con la finalidad de obtener la concentración mínima letal de las nanopartículas para cada cepa bacteriana, se tomaron 10 µl de cada pozo en los cuales no se debería observar crecimiento bacteriano y se sembraron en placas de agar nutritivo, las cuales fueron previamente preparadas según las condiciones del fabricante con el fin de proporcionar un ambiente adecuado para el crecimiento bacteriano.

Las placas con muestras de *N.b.* se incubaron a 37°C por 5 días, mientras que las placas con muestras de *E. coli* y *S. aureus* se incubaron por 24 horas. Al final de estos periodos de incubación se procedió a examinar las placas con el

objetivo de determinar la CML. La CML se define como aquella concentración en la que no se observará crecimiento bacteriano en la placa, lo que indica la efectividad letal de las nanopartículas contra las respectivas cepas bacterianas.

## **5.2. Evaluación del efecto citotóxico de las nanopartículas bimetálicas TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd sobre esplenocitos de ratón BALB/c**

### **5.2.1. Extracción de Bazo**

Con el objetivo de evaluar el efecto citotóxico de las nanopartículas, se procedió a la extracción del bazo de cuatro ratones BALB/c, con edades comprendidas entre las 8 y 12 semanas. Previamente al procedimiento, los ratones fueron anestesiados mediante vía intraperitoneal, utilizando 200 µl de una solución combinada de ketamina/xilazina (100 mg/ml y 20 mg/ml, respectivamente). Una vez que los animales se encontraban bajo los efectos de la anestesia, se les practicó la eutanasia mediante dislocación cervical para garantizar la terminación humanitaria de los ratones. Es importante destacar que todo el procedimiento, incluyendo la eutanasia, fue llevado a cabo de acuerdo con las normativas éticas y protocolos aprobados por el Comité de Bioética de nuestra institución, asegurando el cumplimiento de los estándares éticos en la investigación animal.

Posteriormente, se colocaron los cuerpos en posición de decúbito lateral derecho y se procedió a la desinfección del área lateral con una torunda impregnada en alcohol. Acto seguido, se realizó una incisión de 1 cm de longitud, utilizando un bisturí, justo por debajo del borde costal. Utilizando pinzas de disección sin dientes, para evitar dañar el tejido, se extrajo cuidadosamente el bazo. El órgano extraído fue inmediatamente colocado en una caja Petri, la cual

contenía 3 ml de medio DMEM, enriquecido con un 10% de suero bovino fetal (SBF), 1% de L-Glutamina, así como Penicilina y Estreptomicina (10,000 U/mL y 10 mg/mL, respectivamente). Todo el procedimiento se llevó a cabo asegurando la conservación de la integridad del tejido y manteniendo las condiciones de esterilidad. Finalmente, se aseguró de mantener el tejido a una temperatura constante de 2 °C para preservar su viabilidad hasta el momento de su procesamiento posterior.

### **5.2.2. Preparación de suspensión de esplenocitos**

Una vez que el bazo fue colocado en la caja Petri, se procedió a su desintegración mecánica utilizando el dorso del émbolo de una jeringa de 10 ml. Se presionaron los fragmentos tisulares contra el fondo de la placa hasta que solo quedara la fracción más fibrosa del tejido. La suspensión celular obtenida se filtró a través de un tamiz de nailon de 200 µm de diámetro de poro, recolectándose en un tubo cónico de 15 ml. Con el objetivo de maximizar la recuperación celular, se lavó la caja Petri con 5 ml de DMEM suplementado, y la suspensión resultante se hizo pasar nuevamente por el tamiz, alcanzando un volumen final de 10 ml en el tubo cónico. Este se sometió a centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, y seguidamente se eliminó el sobrenadante. El pellet celular se resuspendió en 5 ml de solución de lisis al 1X (NH<sub>4</sub>Cl), y se incubó a 2°C durante 5 minutos, realizando agitaciones ocasionales. Transcurrido este tiempo, se añadieron 10 ml de DMEM suplementado y se procedió a una nueva centrifugación bajo las mismas condiciones previamente establecidas. Finalmente, las células se resuspendieron en un volumen final de 2 ml. Posteriormente, se procedió a la cuantificación del número total de células utilizando una cámara de Neubauer.

Se tomaron 10  $\mu$ l de la suspensión celular y se mezclaron con 90  $\mu$ l de Azul de tripano al 0.4%. Después de homogenizar adecuadamente, se tomaron 10  $\mu$ l de la suspensión y se colocaron en la cámara de Neubauer para llevar a cabo el conteo.

### **5.2.3. Ensayo de citotoxicidad**

Para evaluar la viabilidad celular de los esplenocitos, se implementó un ensayo de citotoxicidad en placas de 24 pozos. Posterior al conteo celular, la suspensión se normalizó a una concentración de  $0.5 \times 10^5$  células por pozo. A cada pozo se le administraron 50  $\mu$ l de las Np a la concentración de la CMI, así como diluciones 1:10 y 1:100 de la misma. Adicionalmente, se añadió 1 ml de medio DMEM suplementado con un 10% de SBF, 1% de L-Glutamina, así como Penicilina y Estreptomina a concentraciones de 10,000 U/mL y 10 mg/mL, respectivamente. Los esplenocitos, junto con las Np, fueron incubados a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> durante un periodo de 4 horas. Durante este tiempo, se realizaron conteos celulares en los tiempos 0, 1, 3 y 4 horas, empleando la metodología previamente establecida y utilizando azul de tripano al 0.4% para diferenciar entre células vivas y muertas. Cada conteo se realizó por duplicado.

Para el control de la experimentación, se incluyeron diferentes tipos de controles en el ensayo:

1. Control negativo: Células tratadas con 100  $\mu$ l de DMSO al 100%.
2. Control de vehículo: Células tratadas con 50  $\mu$ l de DMSO al 1%.
3. Control positivo: Células sin ningún estímulo.

Finalmente, se calculó el porcentaje de viabilidad celular utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Viabilidad celular} = \frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

### **5.3. Evaluación del efecto de las nanopartículas bimetálicas TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd sobre el actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*.**

#### **5.3.1. Cepas de ratones BALB/c**

Para este estudio, se emplearon 8 ratones hembra BALB/c con edades comprendidas entre las 8 y 12 semanas. Estos se alojaron bajo condiciones de bioseguridad nivel 2 en el laboratorio de experimentación animal perteneciente al servicio de Inmunología. Se les administró una dieta basada en LabDiet y se les proporcionó acceso continuo a agua estéril *ad libitum*. La observación y monitoreo de los ratones se llevó a cabo diariamente, y los protocolos de cuidado e infección de los animales se desarrollaron y ejecutaron en estricto cumplimiento con la normativa mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

#### **5.3.2. Modelo de infección experimental**

El inóculo se obtuvo a partir de la suspensión celular de *N. brasiliensis*, la cual fue preparada y descrita en la sección 5.1.2. Antes de proceder con la inoculación de la bacteria, se administró anestesia a los ratones por vía intraperitoneal, utilizando una solución de ketamina y xilazina en concentraciones de 100 mg/ml y 20 mg/ml, respectivamente. Una vez asegurado el estado de sedación de los roedores, se procedió a la desinfección del cojinete



plantar de la extremidad posterior izquierda, empleando para ello una torunda saturada en alcohol. Acto seguido, se inoculó intradérmicamente un volumen de 100 µl de la suspensión bacteriana, la cual contenía una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC de *Nocardia brasiliensis*.

### **5.3.3. Aplicación del tratamiento**

Una vez confirmada la formación del micetoma, siguiendo la evolución natural de la enfermedad que ocurre entre los 45 y 60 días después de la inoculación, los ratones fueron asignados aleatoriamente a dos grupos distintos:

1. Grupo de tratamiento (n=4): A cada ratón de este grupo se le administraron 20 µl de la nanopartícula TiO<sub>2</sub>-Ag (2) a una concentración de 0.02 ppm, mediante una vía intralesional. Este tratamiento se llevó a cabo cada 24 horas durante un periodo de 30 días, seguido de una administración cada 48 horas durante otros 30 días adicionales
2. Grupo de control (n=4): A cada ratón de este grupo se le aplicaron 20 µl de DMSO al 1%, también por vía intralesional, siguiendo el mismo esquema temporal descrito para el grupo de tratamiento.

Antes de proceder con la administración de los tratamientos, se indujo la sedación de los ratones mediante inhalación de isoflurano, utilizando para ello una torunda. Una vez que los ratones estaban sedados, se desinfectó el área de la inyección con una torunda impregnada en alcohol. Posteriormente, se procedió a inyectar los 20 µl correspondientes, utilizando una jeringa de 1 ml y una aguja de calibre 31G. Para prevenir el reflujo de la solución, se giró suavemente la aguja en el área de la lesión y se aplicó presión con una torunda seca durante 5 segundos.

### 5.3.4. Monitorización de los ratones

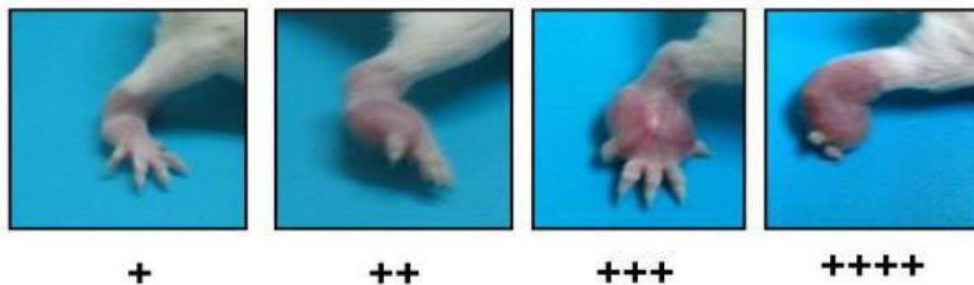
Se realizó un seguimiento diario de los ratones infectados, manteniendo esta observación constante hasta el momento de su eutanasia.

#### 5.3.4.1. Evaluación clínica

Cada 48 horas, se llevó a cabo la evaluación exhaustiva de los ratones, que incluyó observaciones clínicas y la medición de las lesiones presentes en el cojinete plantar. Estas mediciones se realizaron de manera ciega y se repitieron en dos ocasiones para garantizar la objetividad y precisión de los datos recopilados y disminuir el sesgo interoperador. Utilizando las dimensiones anotadas de la lesión (A= ancho, B= alto y C= largo), se aplicó la fórmula para calcular el volumen del elipsoide [48]:

$$V = \frac{\pi}{6}(ABC)$$

Además, se llevó a cabo un seguimiento diario del progreso de la infección, utilizando una escala de evaluación que se describe en la figura 4.



**Figura 4. Escala de Evaluación Clínica del Actinomicetoma por *N. brasiliensis* en el Modelo Experimental.**

Esta figura muestra la clasificación clínica de la evolución de las lesiones en las extremidades inferiores en el actinomicetoma. La clasificación varía desde 0, que representa la ausencia total de lesiones, hasta 4 cruces, que describe un estado de inflamación aguda extendiéndose más allá de la zona del metatarso.

#### **5.3.4.2. Eutanasia**

Una vez finalizado el periodo de tratamiento, se procedió a la eutanasia de los ratones. Para ello, se administró una anestesia compuesta por ketamina y xilazina, en las concentraciones previamente especificadas. Tras verificar que los roedores se encontraban adecuadamente anestesiados, se llevó a cabo la eutanasia mediante dislocación cervical.

#### **5.3.5. Obtención de células de bazo**

La extracción del bazo y la preparación de la suspensión bacteriana se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos detallados en las secciones 5.2.1 y 5.2.2, respectivamente. La suspensión bacteriana se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^5$  células.

#### **5.3.6. Obtención de células de cojinete plantar**

Para llevar a cabo el análisis de los cojinetes plantares infectados pertenecientes a los distintos grupos de ratones, se procedió a su extracción. Antes de la extracción, se desinfectaron los cojinetes con iodopovidona durante 10 minutos. A continuación, se colocaron en una caja Petri que contenía medio DMEM, enriquecido con L-glutamina al 1%, 100 U de penicilina/ml, 100 g de estreptomycin/ml y 10% de SBF. Después de haberlos colocado en la caja Petri, se procedió a limpiar el tejido, retirando la capa más superficial de la piel utilizando unas tijeras Iris y extrayendo el fémur con precaución para evitar contaminar la muestra del micetoma. Posteriormente, se realizó la disgregación mecánica del tejido con unas tijeras Mayo, obteniendo así una masa de consistencia grumosa.

A esta masa se le añadió 1 ml de colagenasa X, previamente diluida 1:10 en medio DMEM. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Durante este periodo, el tejido digerido se maceró suavemente con un émbolo a través de un tamiz celular de nailon estéril con un diámetro de poro de 100 µm. Tras la incubación, las células obtenidas se recogieron en tubos cónicos estériles de 15 ml y se centrifugaron a 1,800 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Para eliminar los glóbulos rojos presentes en la muestra, se añadió solución de lisis 1X (NH<sub>4</sub>Cl), agitando el tubo durante 5 minutos a 2°C. Posteriormente, se realizó una nueva centrifugación bajo las mismas condiciones previamente descritas, se descartó el sobrenadante y se lavó el botón celular dos veces con 10 ml de PBS.

Finalmente, las células se resuspendieron en un volumen total de 2 ml y se contaron en una cámara de Neubauer para ajustar la suspensión a 1x10<sup>5</sup> células. Este procedimiento se llevó a cabo bajo estrictas condiciones de esterilidad

### **5.3.7. Citometría de flujo**

Las suspensiones celulares obtenidas tanto del cojinete plantar como del bazo fueron ajustadas a una concentración de 1x10<sup>5</sup> células/ml. A continuación, se añadió 1 ml de Buffer bloqueador a cada tubo destinado para la citometría de flujo, procediendo a incubar las muestras durante 30 minutos a 4°C en condiciones de oscuridad total. Posteriormente, se realizó un lavado utilizando 1 ml de PBS, seguido de una centrifugación a 1800 rpm durante 10 minutos. Las células fueron entonces resuspendidas en 200 µl de buffer FACS y se procedió a la incubación con anticuerpos monoclonales (MAb) Anti-CD3, Anti-CD4 y Anti-

CD8. Esta incubación se llevó a cabo durante 30 minutos, manteniendo las muestras en la oscuridad.

Tras este proceso, se realizó un lavado adicional con PBS, seguido de una centrifugación con las mismas condiciones previamente descritas, para finalmente resuspender el pellet celular en 200 µl de PBS. La adquisición de los datos se efectuó utilizando un citómetro de flujo FACS Canto II y un LSR Fortesa, registrando 100,000 eventos por cada tubo de citometría, y repitiendo cada adquisición para asegurar la reproducibilidad de los resultados. El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el software BD FACSDiva.

#### **5.3.7.1. Anticuerpos Monoclonales**

Los MAb de rata anti-ratón utilizados fueron: Anti-CD3, Anti-CD4 y Anti-CD8, conjugados con APC-Cy7, Pacific blue y V500, respectivamente.

**Tabla III. Anticuerpos Monoclonales para Inmunofenotipificación.**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Clona</b>	<b>Fluorocromo</b>
<b>Anti-CD3</b>	0.2 mg/ml	17A2	APC-CY7
<b>Anti-CD4</b>	0.2 mg/ml	RM4-5	Pacific Blue
<b>Anti-CD8</b>	0.2 mg/ml	53-6.7	V 500

Se emplearon 2 µl de los Mabs previamente mencionados para marcar las células. Dado que no existía superposición en la señal de fluorescencia entre los tres fluorocromos utilizados, se procedió a combinar los tres Mabs en un solo tubo, el cual contenía la muestra correspondiente, ya fuera bazo o cojinete plantar.

### **5.3.7.2. Estrategia de análisis**

Para analizar las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en las muestras, se siguió una estrategia de análisis para garantizar la precisión y la exclusión de eventos no deseados. Primero, se eliminaron los eventos correspondientes a células dobles o triples mediante un gate FSC-A vs FSC-H, asegurando que solo se consideraran eventos de células individuales. Posteriormente, se procedió a la identificación de los linfocitos en función de sus características morfológicas utilizando el gate FSC-A vs SSC-A, que permitió la selección de la población linfocitaria de interés. Para diferenciar entre linfocitos T cooperadores (CD4+) y linfocitos T citotóxicos (CD8+), se emplearon marcadores específicos de superficie. Se crearon dos gráficos de dispersión: uno que representaba CD3+(APC-Cy7) vs CD4+(Pacific blue) y otro que representaba CD3+(APC-Cy7) vs CD8+(V500). Esto facilitó la identificación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ en las muestras. Por último, realizamos el análisis de datos para cuantificar las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+, y se registraron los eventos que caían dentro de los gates específicos para cada población.

### **5.3.8. Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC)**

Después de obtener la suspensión celular del cojinete plantar, se tomó una muestra de 100 µl para llevar a cabo diluciones seriadas en proporción 1:10, abarcando un rango de  $10^0$  a  $10^8$ , y utilizando solución salina estéril. A continuación, se aplicaron 20 µl de cada dilución bacteriana en placas de agar BHI, siguiendo la técnica de Miles & Misra [49]. Luego de un periodo de incubación de 5 días a 37°C, se contabilizó el número de UFC en cada alícuota, empleando un contador de colonias Quebec Darkfield de Reichert-Jung. Para

calcular la cantidad de UFC/ml, se tomó el promedio de colonias desarrolladas multiplicándolo por 50 y por el factor de dilución correspondiente.

### **5.3.9. Evaluación histopatológica**

Antes de proceder a la digestión enzimática del cojinete plantar, se extrajo una muestra de tejido del micetoma, la cual fue utilizada para evaluar cambios morfológicos en la microarquitectura de la lesión. Las muestras se fijaron en 200 ml de formaldehído al 10% durante un periodo de 7 días, garantizando así la conservación óptima de la estructura tisular. Posteriormente, se llevó a cabo una deshidratación progresiva mediante una serie de baños en concentraciones seriadas de alcohol (70%, 80%, 95% y 100%), permaneciendo la muestra 24 horas en cada concentración. A continuación, los tejidos fueron aclarados en xilol, sumergiéndolos en tres baños consecutivos de 20 minutos cada uno. Una vez aclarados, se procedió a incluirlos en bloques de parafina, los cuales se dejaron enfriar durante 3 horas antes de ser seccionados en láminas de 5 micrómetros utilizando un microtomo. Previo a la tinción, las secciones de tejido fueron desparafinadas en xileno y rehidratadas mediante una serie de baños en concentraciones decrecientes de alcohol, culminando con un enjuague en agua destilada. La tinción se inició con la aplicación de hematoxilina diluida en una proporción 1:1, seguida de enjuagues en agua destilada. Posteriormente, se aplicó eosina también diluida 1:1, finalizando con un enjuague para retirar el exceso de colorante. Para concluir el proceso, las secciones fueron nuevamente deshidratadas, aclaradas en xileno, montadas en un medio de montaje a base de resina y dejadas secar, quedando así preparadas para su análisis microscópico.

#### **5.4. Análisis estadístico**

Se determinaron los valores estadísticos descriptivos para cada uno de los grupos y en cada análisis. La distribución de los datos se determinó usando la prueba de Shapiro-Wilk. Para el caso de comparaciones múltiples de viabilidad celular, y en los casos donde la dispersión de los datos no era normal, se realizó el análisis mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la Prueba de Dunn para comparaciones múltiples. Por otro lado, el volumen del cojinete plantar, así como la cuantificación de subpoblaciones celulares de linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos tanto en el bazo como en el cojinete plantar, se evaluaron mediante la Prueba de U de Mann Whitney. Para la determinación de UFCs, se empleó la Prueba de Student. Se estableció un valor de  $p < 0.05$  como umbral para considerar los resultados estadísticamente significativos. Los datos se presentaron en gráficos, mostrando la media y la desviación estándar o la mediana y el error estándar, dependiendo de la distribución de los datos. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software GraphPad Prism V.9.



# CAPÍTULO VI

## RESULTADOS

### 6.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas bimetálicas TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd para *Nocardia brasiliensis*

Se determinaron las Concentraciones Mínimas Inhibitorias y Letales de las nanopartículas bimetálicas frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Nocardia brasiliensis*.

Para *Staphylococcus aureus* (Tabla IV), las nanopartículas TiO<sub>2</sub>-Ag (1) y TiO<sub>2</sub>-Ag (2) exhibieron una CMI de 4 ppm, mientras que las nanopartículas TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd presentaron CMI de 3 ppm y 4 ppm, respectivamente. En términos de CML, tanto TiO<sub>2</sub>-Ag (1) como TiO<sub>2</sub>-Ag (2) y TiO<sub>2</sub>-Gd tuvieron una CML de 5 ppm, en contraste con las nanopartículas TiO<sub>2</sub>-V, cuya CML se situó en 4 ppm.

**Tabla IV. Concentración Mínima inhibitoria y Concentración Mínima Letal de las Nanopartículas Bimetálicas TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd para *Staphylococcus aureus***

Tratamiento	Rango	CMI 50	CMI 90	CML
TiO <sub>2</sub> -Ag (1)	10-0.250 ppm	2 ppm	4 ppm	5 ppm
TiO <sub>2</sub> -Ag (2)	10-0.250 ppm	2 ppm	4 ppm	5 ppm
TiO <sub>2</sub> -V	10-0.250 ppm	1.5 ppm	3 ppm	4 ppm
TiO <sub>2</sub> -Gd	10-0.250 ppm	2 ppm	4 ppm	5ppm
Amikacina	64-0.5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	8 µg/ml

En lo que respecta a *Escherichia coli*, las nanopartículas TiO<sub>2</sub>-Ag (1), TiO<sub>2</sub>-Ag (2), TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd mostraron una CMI uniforme de 4 ppm (Tabla V). En relación con la CML, las nanopartículas TiO<sub>2</sub>-Ag (1) y TiO<sub>2</sub>-Gd registraron una CML de 5 ppm, mientras que para TiO<sub>2</sub>-Ag (2) y TiO<sub>2</sub>-V, la CML fue de 4 ppm.

**Tabla V. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Letal de las Nanopartículas Bimetálicas TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd para *Escherichia coli*.**

Tratamiento	Rango	CMI 50	CMI 90	CML
TiO <sub>2</sub> -Ag (1)	10-0.250 ppm	2 ppm	4 ppm	5 ppm
TiO <sub>2</sub> -Ag (2)	10-0.250 ppm	2 ppm	4 ppm	4 ppm
TiO <sub>2</sub> -V	10-0.250 ppm	2 ppm	4 ppm	4 ppm
TiO <sub>2</sub> -Gd	10-0.250 ppm	2 ppm	4 ppm	5ppm
Amikacina	64-0.5 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml

En el caso de *Nocardia brasiliensis*, las nanopartículas TiO<sub>2</sub>-Ag (2), TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd evidenciaron una CMI de 2 ppm, en contraposición a la nanopartícula TiO<sub>2</sub>-Ag (1) que mostró una CMI de 3 ppm, como se observa en la tabla VI. En términos de CML, todas las nanopartículas evaluadas demostraron tener una CML de 3 ppm.

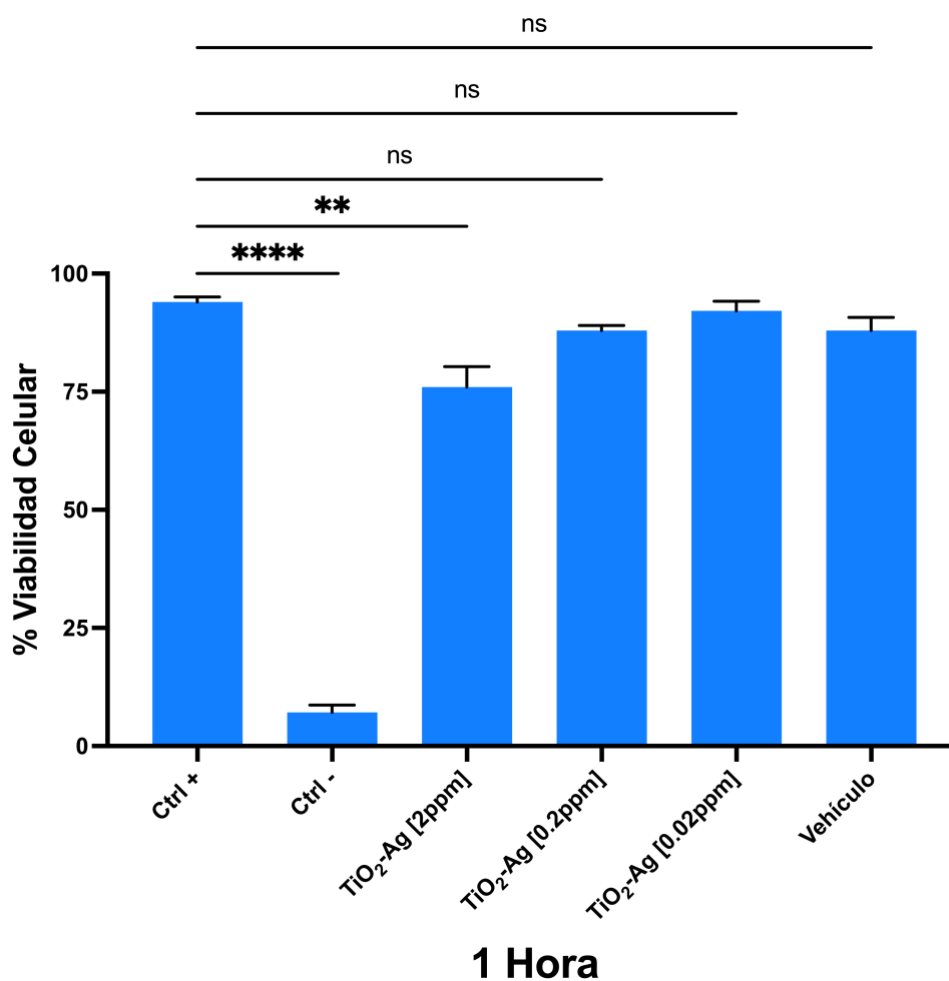
**Tabla VI. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Letal de las Nanopartículas Bimetálicas TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd para *Nocardia brasiliensis***

<b>Tratamiento</b>	<b>Rango</b>	<b>CMI 50</b>	<b>CMI 90</b>	<b>CML</b>
TiO <sub>2</sub> -Ag (1)	10-0.250 ppm	1.5 ppm	3 ppm	3 ppm
TiO <sub>2</sub> -Ag (2)	10-0.250 ppm	1 ppm	2 ppm	3 ppm
TiO <sub>2</sub> -V	10-0.250 ppm	1 ppm	2 ppm	3 ppm
TiO <sub>2</sub> -Gd	10-0.250 ppm	1 ppm	2 ppm	3 ppm
Amikacina	64-0.5 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml

Dada la superioridad en la eficacia inhibitoria de las nanopartículas TiO<sub>2</sub>-Ag (2), TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd en comparación con la TiO<sub>2</sub>-Ag (1), se optó por utilizar exclusivamente las primeras en los experimentos subsiguientes.

**6.2. Evaluación del efecto citotóxico de las nanopartículas bimetálicas TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd sobre esplenocitos de ratón BALB/c**

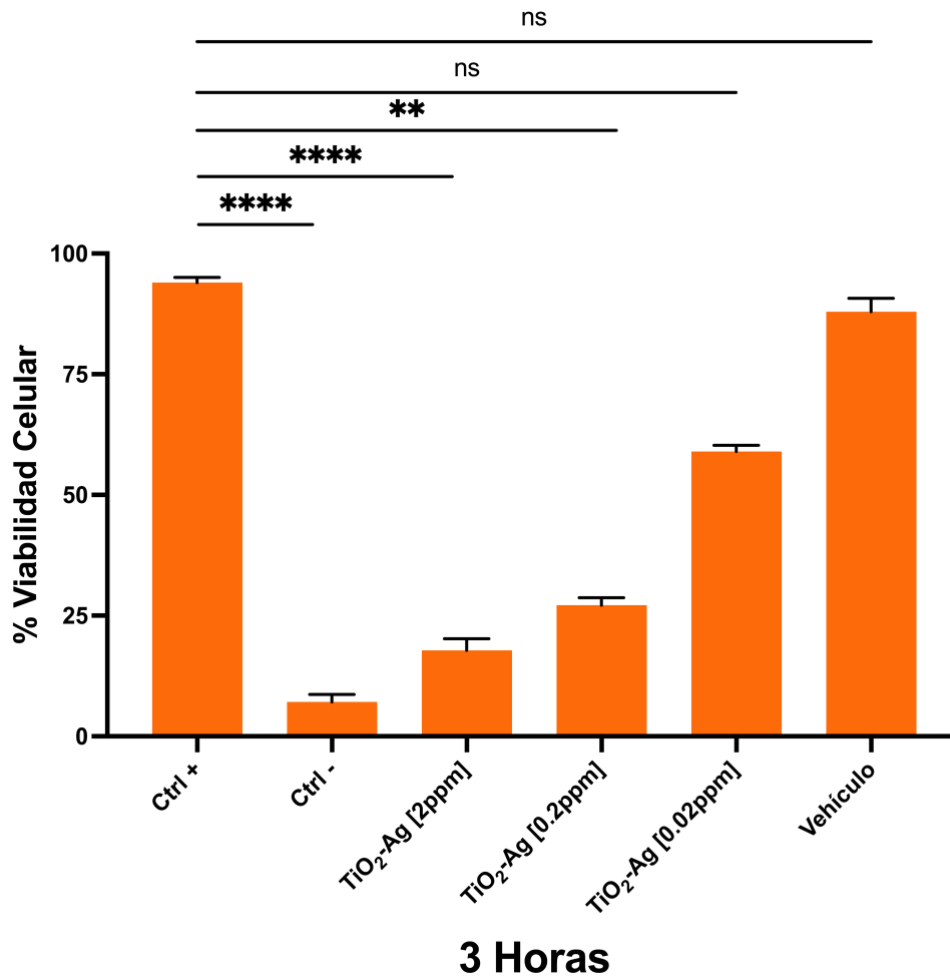
Los esplenocitos expuesto a las concentraciones de 2 ppm, 0.2 ppm y 0.02 ppm de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (2) presentaron un porcentaje de viabilidad celular en la primera hora de 75.96 %, 87.92% y 92.12 %, respectivamente, como se observa en la figura 5. No se observó diferencia estadísticamente significativa respecto al control positivo en el cual se determinó un porcentaje de viabilidad celular de 93.92%.



**Figura 5. Viabilidad Celular de Esplenocitos Expuestos a Diferentes Concentraciones de TiO<sub>2</sub>-Ag (2) Durante Una Hora.**

En esta figura, se presenta el porcentaje de viabilidad celular en células de bazo de ratones sanos. Se sometió una suspensión de esplenocitos, obtenidos de ratones BALB/c, a la acción de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (2) en concentraciones de 2 ppm, 0.2 ppm y 0.02 ppm durante una hora (n=4). Se realizaron pruebas estadísticas utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunn para comparaciones múltiples.  $p > 0.05$  (ns),  $< 0.05$  (\*),  $< 0.01$  (\*\*),  $< 0.001$ (\*\*\*) y  $< 0.0001$ (\*\*\*\*).

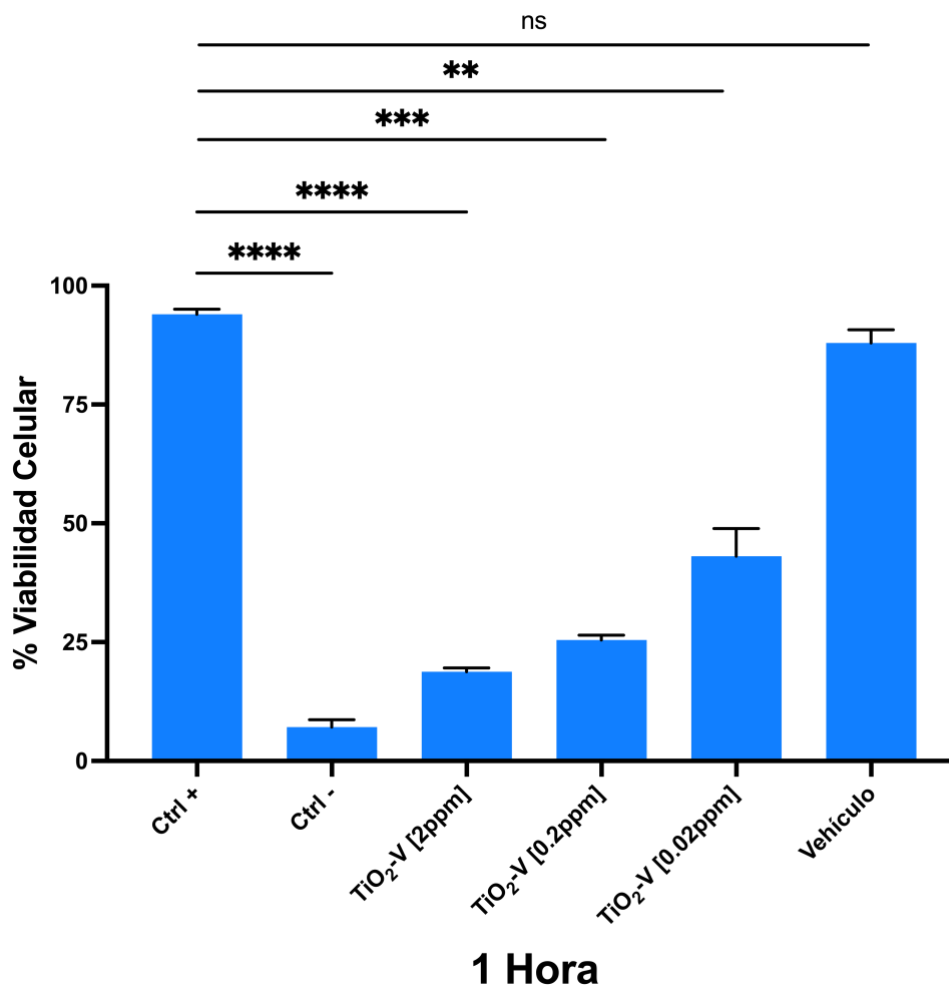
Después de tres horas de exposición (Figura 6) a la Np TiO<sub>2</sub>-Ag (2), se detectó una reducción notablemente significativa en la viabilidad celular en comparación con el control positivo. Los porcentajes de viabilidad fueron del 17.73% y 27.15% para las concentraciones de 2 ppm y 0.2 ppm, respectivamente. Aunque también se observó una reducción en la viabilidad al 60.2% para la concentración de 0.02 ppm, esta no resultó ser estadísticamente significativa en comparación con el control positivo.



**Figura 6. Viabilidad Celular de Esplenocitos Expuestos a Diferentes Concentraciones de TiO<sub>2</sub>-Ag (2) Durante Tres Horas.**

En esta figura, se presenta el porcentaje de viabilidad celular en células de bazo de ratones sanos. Se sometió una suspensión de esplenocitos, obtenidos de ratones BALB/c, a la acción de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (2) en concentraciones de 2 ppm, 0.2 ppm y 0.02 ppm durante tres horas (n=4). Se realizaron pruebas estadísticas utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunn para comparaciones múltiples. p > 0.05 (ns), < 0.05 (\*), < 0.01 (\*\*), < 0.001 (\*\*\*) y < 0.0001(\*\*\*\*)

En cuanto a las nanopartículas TiO<sub>2</sub>-V, se detectó un efecto citotóxico evidente desde la primera hora post-exposición, con porcentajes de viabilidad celular del 18.79%, 25.46% y 40.06% para las concentraciones de 2 ppm, 0.2 ppm y 0.02 ppm, respectivamente. Esto representó una diferencia altamente significativa en comparación con el control positivo, que presentó un porcentaje de viabilidad celular del 93.99%, tal como se muestra en la figura 7.

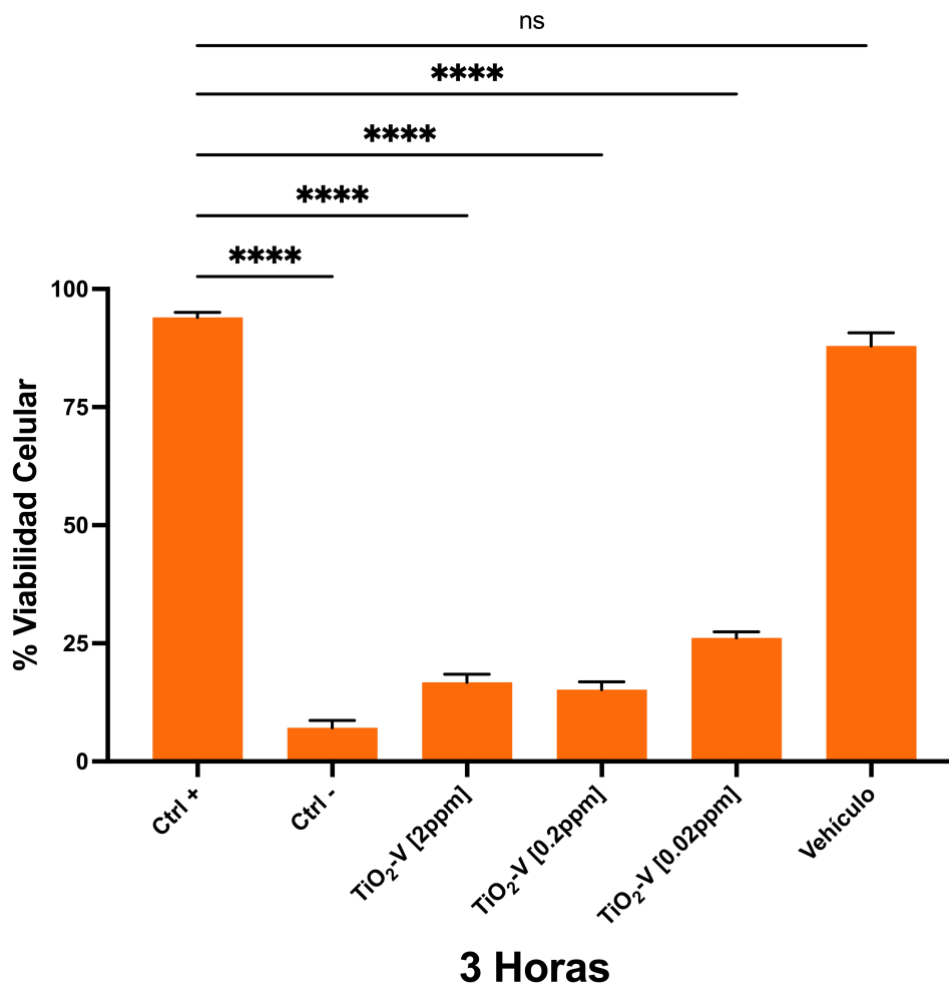


**Figura 7. Viabilidad Celular de Esplenocitos Expuestos a Diferentes Concentraciones de TiO<sub>2</sub>-V Durante Una Hora.**

En esta figura, se presenta el porcentaje de viabilidad celular en células de bazo de ratones sanos. Se sometió una suspensión de esplenocitos, obtenidos de ratones BALB/c, a la acción de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-V en concentraciones de 2 ppm, 0.2 ppm y 0.02 ppm durante una hora (n=4). Se realizaron pruebas estadísticas utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunn para comparaciones múltiples.  $p > 0.05$  (ns),  $< 0.05$  (\*),  $< 0.01$  (\*\*),  $< 0.001$ (\*\*\*) y  $< 0.0001$ (\*\*\*\*).



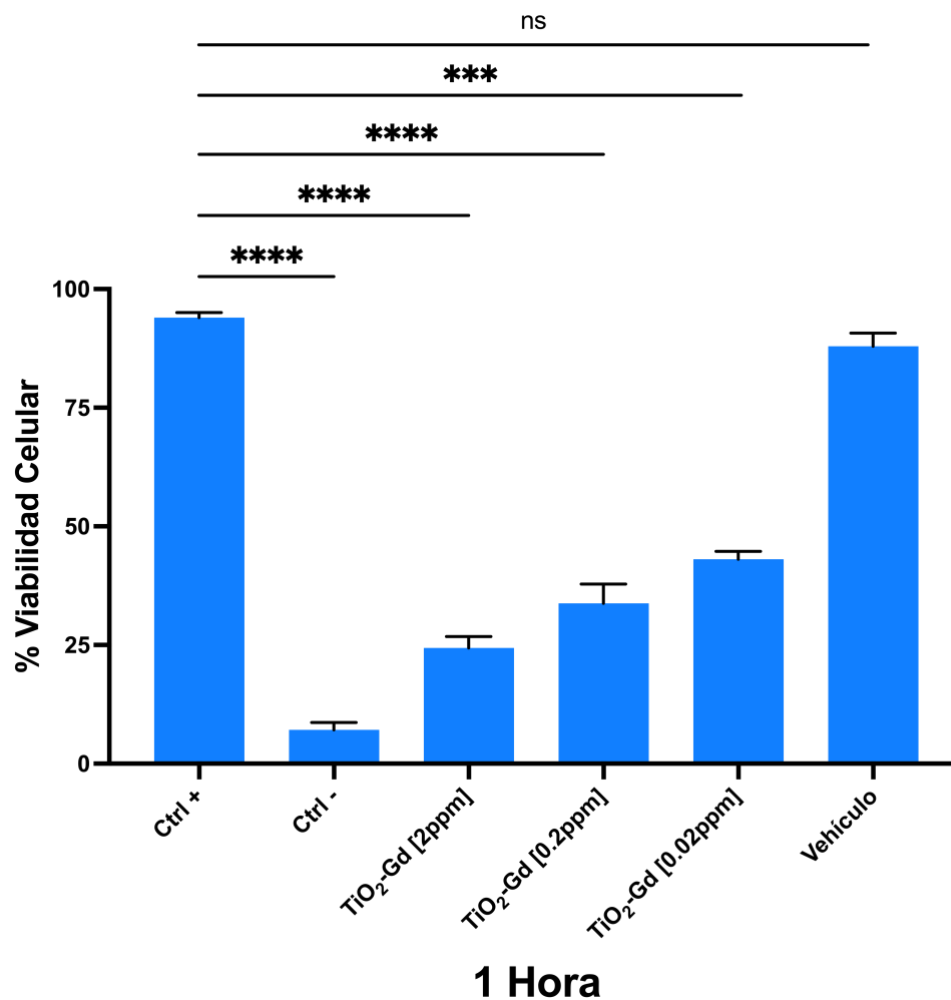
Este fenómeno se mantuvo constante a las tres horas de exposición para las nanopartículas  $\text{TiO}_2\text{-V}$  como se muestra en la figura 8, evidenciando una disminución considerable en la viabilidad celular para las concentraciones de 0.2 ppm y 0.02 ppm, con porcentajes del 15.21% y 26.79%, respectivamente.



**Figura 8. Viabilidad Celular de Esplenocitos Expuestos a Diferentes Concentraciones de TiO<sub>2</sub>-V Durante Tres Horas.**

En esta figura, se presenta el porcentaje de viabilidad celular en células de bazo de ratones sanos. Se sometió una suspensión de esplenocitos, obtenidos de ratones BALB/c, a la acción de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-V en concentraciones de 2 ppm, 0.2 ppm y 0.02 ppm durante tres horas (n=4). Se realizaron pruebas estadísticas utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunn para comparaciones múltiples. p > 0.05 (ns), < 0.05 (\*), < 0.01 (\*\*), < 0.001 (\*\*\*) y < 0.0001(\*\*\*\*).

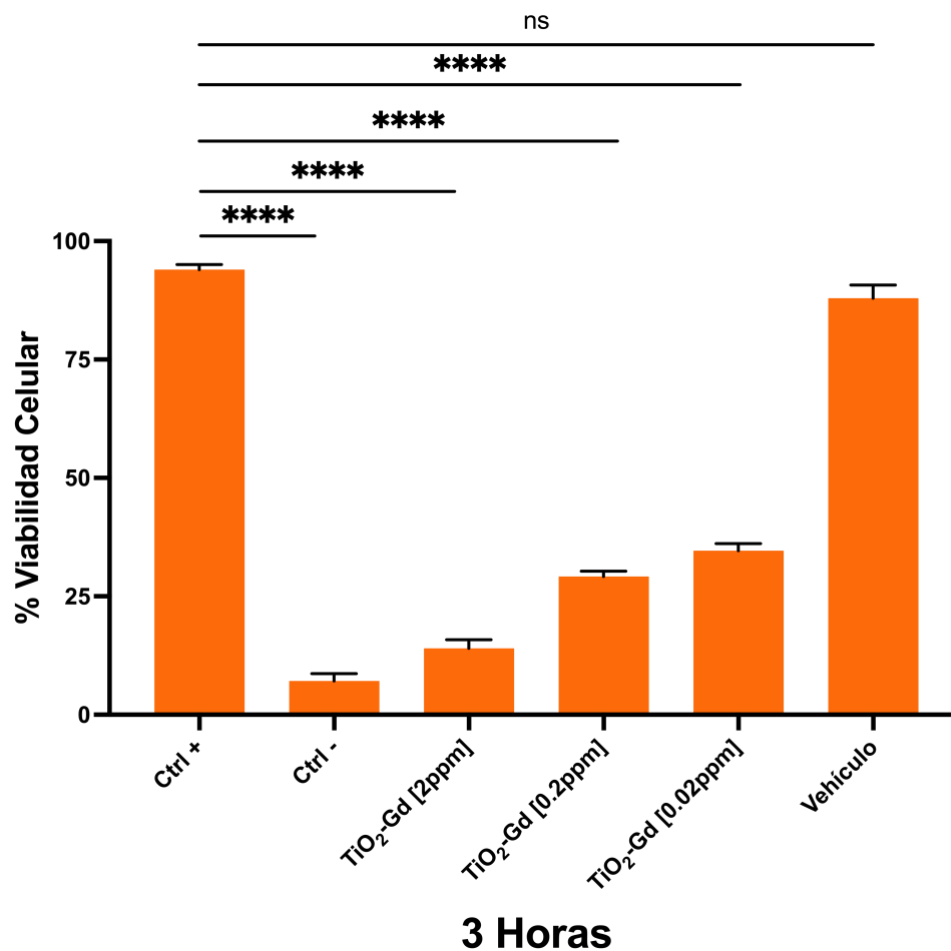
En términos de viabilidad celular, las nanopartículas  $\text{TiO}_2\text{-Gd}$  exhibieron un comportamiento muy similar al de las  $\text{TiO}_2\text{-V}$ , presentando porcentajes de viabilidad celular entre el 24.39% y el 43.10% a la primera hora post-exposición para las concentraciones estudiadas (Figura 9).



**Figura 9. Viabilidad Celular de Esplenocitos Expuestos a Diferentes Concentraciones de TiO<sub>2</sub>-Gd Durante Una Hora.**

En esta figura, se presenta el porcentaje de viabilidad celular en células de bazo de ratones sanos. Se sometió una suspensión de esplenocitos, obtenidos de ratones BALB/c, a la acción de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Gd en concentraciones de 2 ppm, 0.2 ppm y 0.02 ppm durante una hora (n=4). Se realizaron pruebas estadísticas utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunn para comparaciones múltiples.  $p > 0.05$  (ns),  $< 0.05$  (\*),  $< 0.01$  (\*\*),  $< 0.001$ (\*\*\*) y  $< 0.0001$ (\*\*\*\*).

A las tres horas, esta tendencia se mantuvo, tal y como se aprecia en la figura 10, mostrando porcentajes de viabilidad celular del 14.30%, 29.21% y 34.36% para las concentraciones de 2 ppm, 0.2 ppm y 0.02 ppm, respectivamente. Esto resultó en una diferencia altamente significativa en comparación con el control, que registró un porcentaje de viabilidad celular del 93.89%.



**Figura 10. Viabilidad Celular de Esplenocitos Expuestos a Diferentes Concentraciones de TiO<sub>2</sub>-Gd Durante Tres Horas.**

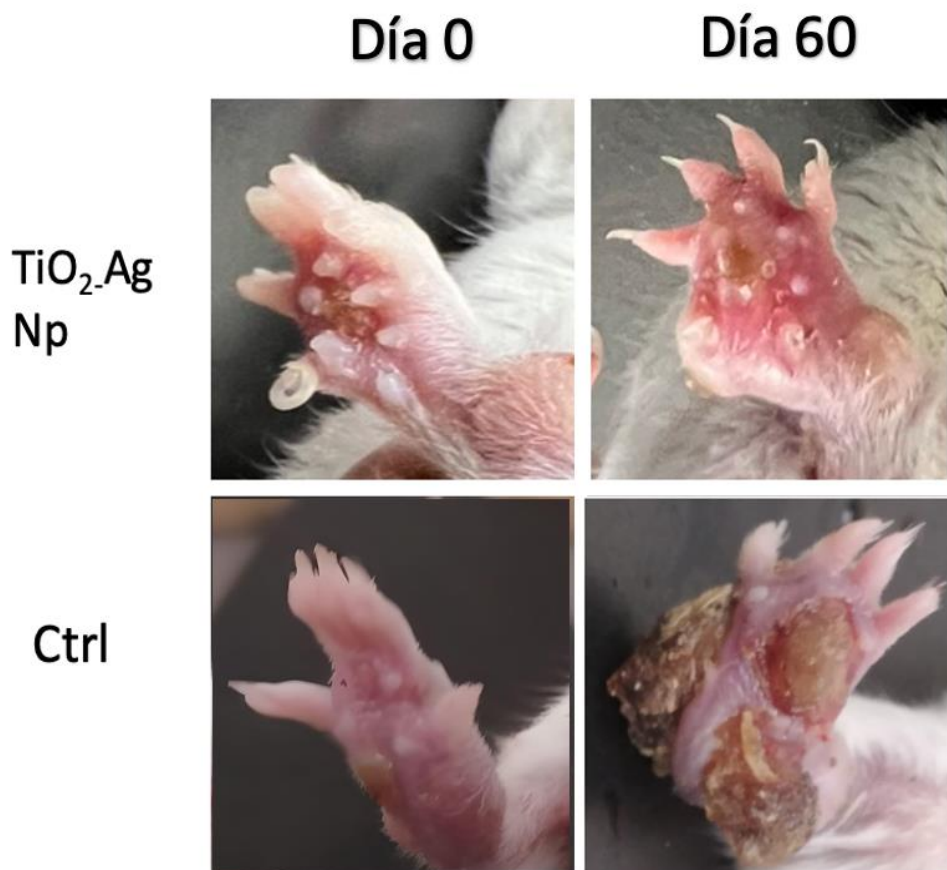
En esta figura, se presenta el porcentaje de viabilidad celular en células de bazo de ratones sanos. Se sometió una suspensión de esplenocitos, obtenidos de ratones BALB/c, a la acción de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Gd en concentraciones de 2 ppm, 0.2 ppm y 0.02 ppm durante tres horas (n=4). Se realizaron pruebas estadísticas utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunn para comparaciones múltiples. p > 0.05 (ns), < 0.05 (\*), < 0.01 (\*\*), < 0.001(\*\*\*) y < 0.0001(\*\*\*\*).

Dado que el porcentaje más alto de viabilidad celular se observó en las nanopartículas TiO<sub>2</sub>-Ag (2) a una concentración de 0.02 ppm, se decidió utilizar exclusivamente estas nanopartículas para los experimentos subsiguientes.

### **6.3. Evaluación del efecto de las nanopartículas bimetálicas TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd sobre el actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*.**

Se estableció un modelo experimental *in vivo* para evaluar el efecto de las nanopartículas TiO<sub>2</sub>-Ag (2) sobre el actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*.

A nivel clínico, se observan diferencias macroscópicas en las de las lesiones entre el grupo tratado y el grupo control, como se evidencia en la figura 11. En el grupo tratado, se aprecia un área eritematosa con múltiples fístulas en el cojinete plantar, mientras que en el grupo control, la lesión presenta una tonalidad más pálida, con áreas de escaras y un aspecto más frágil.

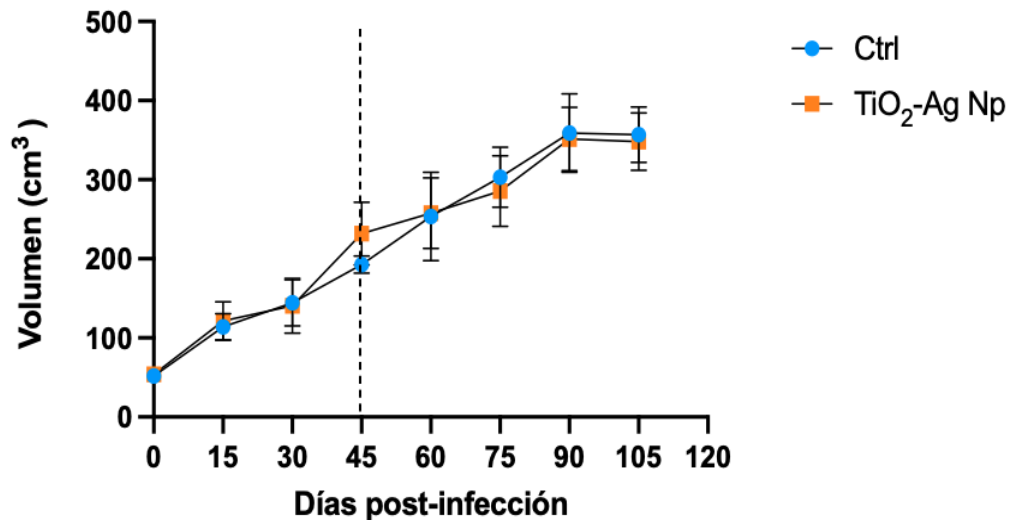


**Figura 11. Evolución Clínica del Actinomicetoma por *N. brasiliensis* entre el Grupo Tratado con TiO<sub>2</sub>-Ag (2) y el Grupo Control.**

En la presente figura se muestra la evolución clínica del actinomicetoma. Se condujo un ensayo controlado, donde un grupo de ratones BALB/c (n=4), con actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*, fue tratado con nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (2) [0.02 ppm]. La administración del tratamiento fue diaria durante los primeros 30 días, seguida de una dosis cada 48 horas en el siguiente periodo de 30 días. Paralelamente, se estableció un grupo control al que se le suministró DMSO al 1%, siguiendo el mismo esquema de dosificación. El día cero marca el comienzo del tratamiento, mientras que el día 60 señala su conclusión.



Sin embargo, no se detectó una diferencia estadísticamente significativa (Figura 12) en el volumen de la lesión entre el grupo tratado con TiO<sub>2</sub>-Ag (2) y el grupo control.

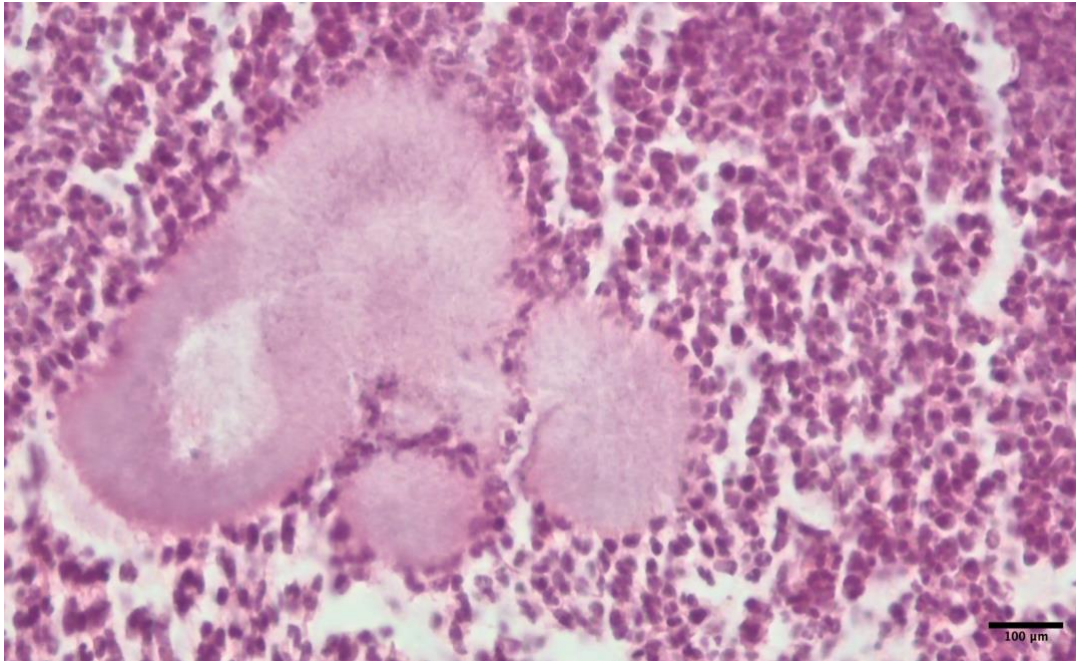


**Figura 12. Comparación del Volumen del Actinomicetoma por *N. brasiliensis* entre Grupos.**

En la presente figura se muestra el volumen del actinomicetoma. Se realizaron mediciones en los cojinetes plantares de los grupos tratados con TiO<sub>2</sub>-Ag (2) y del grupo control, ambos conformados por cuatro vectores (n=4). Para determinar el volumen, se aplicó la fórmula de la elipse. La línea discontinua señala el comienzo del periodo de tratamiento. Se observó un incremento continuo de las lesiones en ambos grupos.

En cuanto a la microarquitectura de la lesión, se observan diferencias sustanciales entre ambos grupos. En el grupo control (Figura 13), se identifica el microabsceso típico de los actinomicetomas por *Nocardia brasiliensis*, con un centro de aspecto eosinofílico, rodeado por una gran cantidad de células

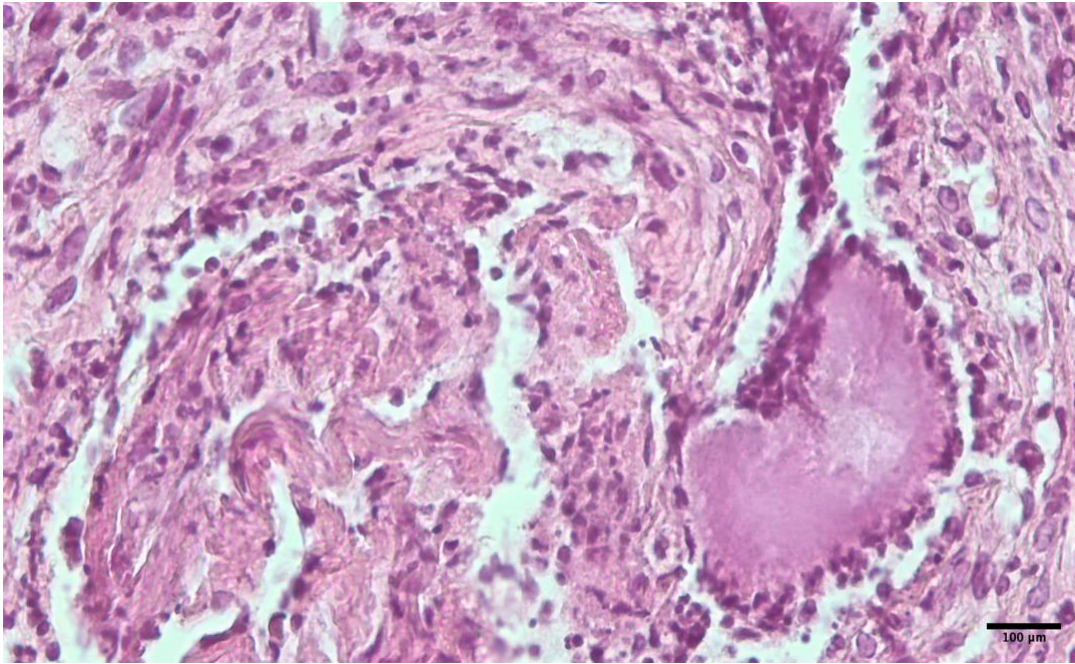
polimorfonucleares, células gigantes multinucleadas y escasas células mononucleares.



**Figura 13. Actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* del Grupo Control.**

La presente microscopía revela la presencia de un microabsceso típico de actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*. Se observan una estructura filamentosa de *N. brasiliensis*, dispuestas de manera radial. En la periferia del microabsceso, se aprecia una marcada infiltración predominantemente de células polimorfonucleares. H&E, 40X.

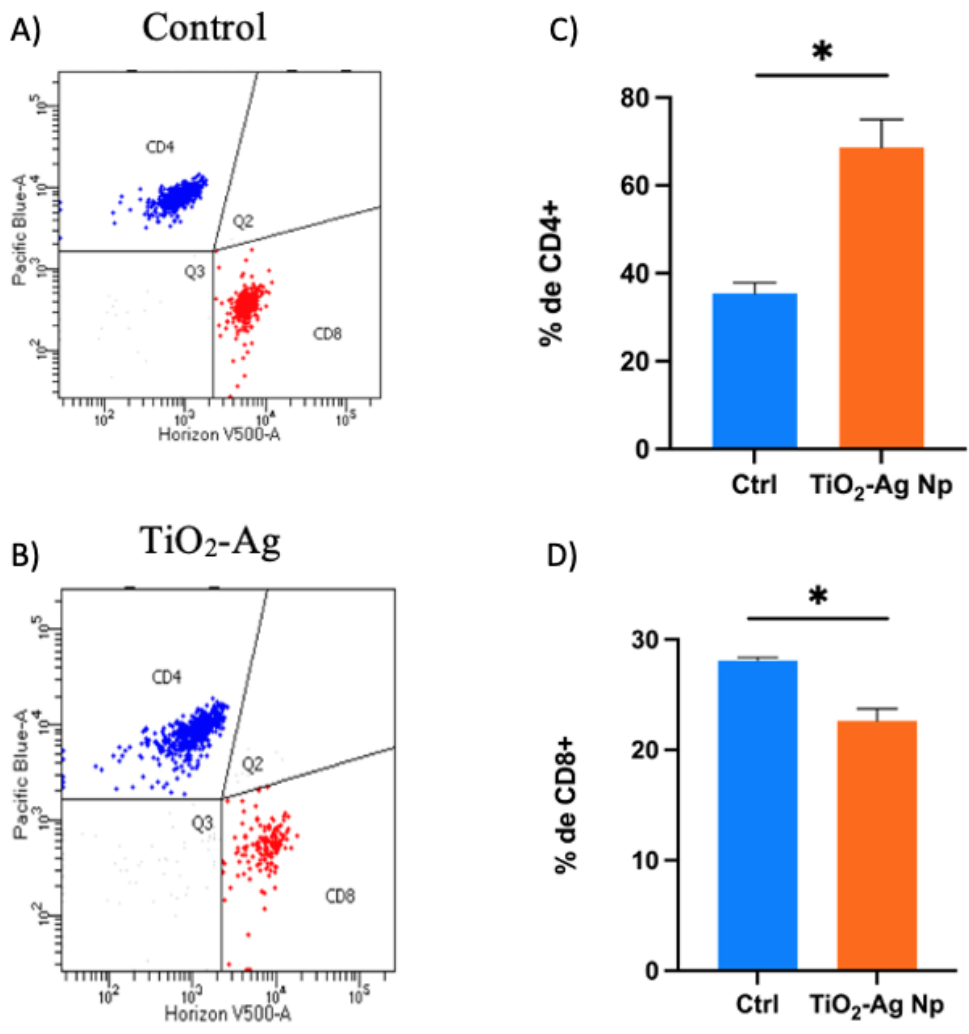
Por otro lado, en la microscopía del grupo tratado con TiO<sub>2</sub>-Ag (2) podemos observar una cantidad más abundante de células mononucleares, así como tejido fibroso y escasas células polimorfonucleares como se aprecia en la figura 14.



**Figura 14. Actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* del Grupo Tratado con Np de TiO<sub>2</sub>-Ag (2).**

La presente microscopía exhibe un microabsceso asociado a actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis* con características histológicas atípicas. Se aprecian células mononucleares distribuidas alrededor de las estructuras filamentosas características de *Nocardia*. Además, es notable la presencia marcada de tejido fibroso. H&E, 40X.

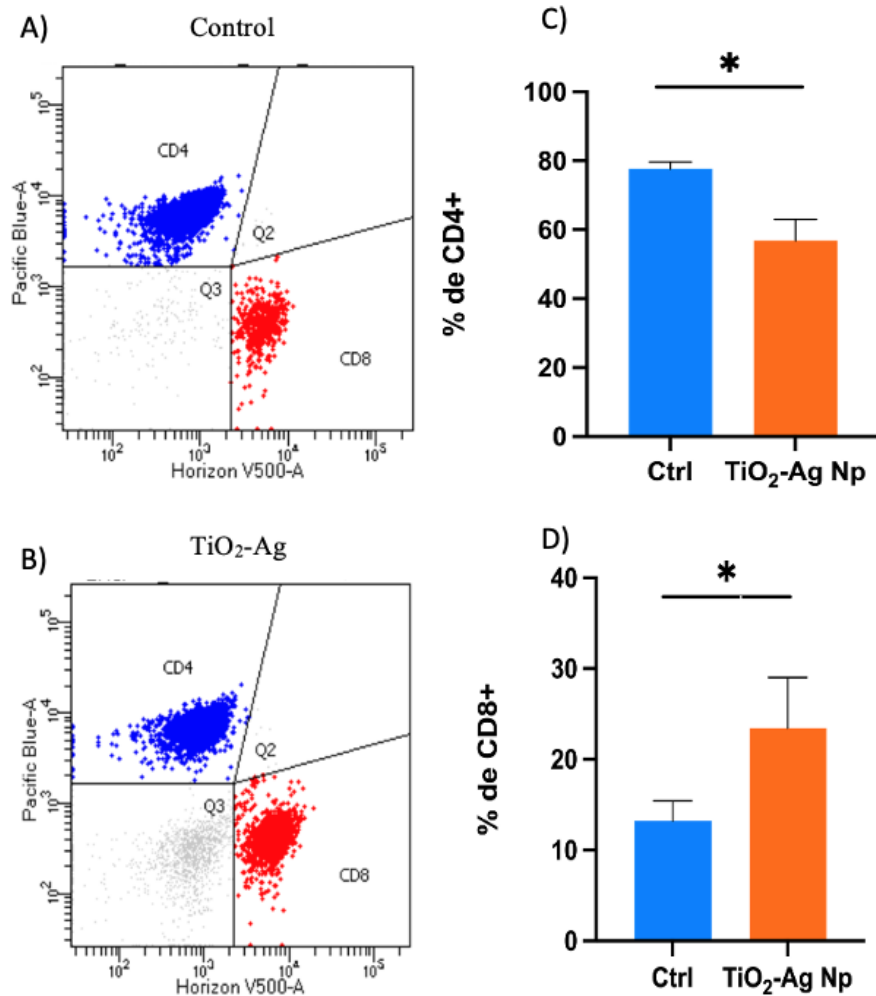
Para corroborar estos cambios, se realizó un inmunofenotipo mediante citometría de flujo, determinando las subpoblaciones celulares de linfocitos T tanto a nivel local en el actinomicetoma como en el bazo, que es un órgano linfoide secundario que contribuye a la respuesta inmunológica a nivel sistémico.



**Figura 15. Efecto de las Nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (2) en la Distribución de Linfocitos T CD4+ y CD8+ a Nivel Local.**

En la presente figura se muestra el efecto de las Np en el actinomicetoma. A-B) Análisis de citometría de flujo de linfocitos T CD4+ (azul) y CD8+ (rojo) en muestras Control (A) y tratadas con nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (2) (B). C) Representación gráfica del porcentaje de células CD4+ en ambos grupos, mostrando un aumento significativo en el grupo tratado con TiO<sub>2</sub>-Ag (2). D) Representación gráfica del porcentaje de linfocitos CD8+ en ambos grupos, evidenciando una disminución en el grupo tratado con TiO<sub>2</sub>-Ag (2). n=4; Prueba U de Mann-Whitney. p > 0.05 (ns), < 0.05 (\*), < 0.01 (\*\*), < 0.001(\*\*\*) y < 0.0001(\*\*\*\*).

En la figura 15, se aprecia una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de linfocitos T CD4+, siendo mayor en el grupo tratado (35.4% vs 68.6%,  $p=0.047$ ), y una menor proporción de linfocitos T CD8+ (28.1% vs 21.6%,  $p=0.05$ ), esto a nivel del cojinete plantar. A nivel sistémico, en el bazo, se observa una menor cantidad de linfocitos T CD4+ en el grupo tratado (77.7% vs 56.9%,  $p=0.045$ ) y un porcentaje mayor de linfocitos T CD8+ (13.2% vs 23.45%,  $p=0.042$ ), como se muestra en la figura 16.

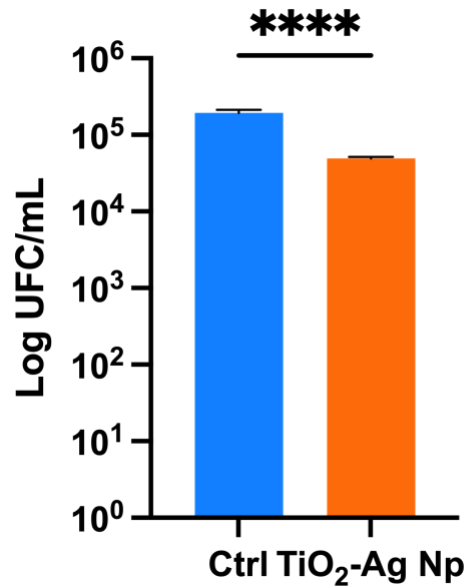


**Figura 16. Alteraciones en las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en el bazo de ratones BALB/c tras tratamiento con nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (2)**

En la presente figura de muestra el efecto de las Np en el bazo. A-B) Representación gráfica de citometría de flujo mostrando la distribución de linfocitos T CD4+ (azul) y CD8+ (rojo) en el bazo de ratones BALB/c. A) muestra el grupo Control y B) el grupo tratado con Np de TiO<sub>2</sub>-Ag (2). C) Porcentaje de linfocitos CD4+ en ambos grupos, evidenciando una disminución en los linfocitos CD4+ tras el tratamiento (2). D) Porcentaje de linfocitos CD8+ en ambos grupos, demostrando un incremento en la presencia de estos linfocitos en el grupo tratado. n=4; Prueba U de Mann-Whitney. p > 0.05 (ns), < 0.05 (\*), < 0.01 (\*\*), < 0.001 (\*\*\*) y < 0.0001(\*\*\*\*).

Estos resultados sugieren que las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (2) ejercen un efecto inmunomodulador potencial.

Para evaluar el efecto antimicrobiano *in vivo* de las nanopartículas, se cuantificaron las unidades formadoras de colonias en la lesión. En la figura 17 se observa una reducción estadísticamente muy significativa en el grupo tratado con TiO<sub>2</sub>Ag (2) en comparación con el grupo control ( $1.94 \times 10^5$  vs  $0.49 \times 10^5$ ;  $p < 0.0001$ ), sugiriendo entonces un efecto antimicrobiano sobre el micetoma.



**Figura 17. Efecto de las Nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (2) en la Reducción de la Carga Bacteriana de *Nocardia brasiliensis*.**

En la figura se muestra la comparación de la carga bacteriana, expresada en logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias (Log UFC/mL), entre ratones del grupo Control (Ctrl) y aquellos tratados con nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (2). Se observa una disminución significativa en la carga bacteriana en el grupo tratado con las nanopartículas en comparación con el grupo Control. n=4; Prueba T de Student. p > 0.05 (ns), < 0.05 (\*), < 0.01 (\*\*), < 0.001(\*\*\*) y < 0.0001(\*\*\*\*).



## CAPÍTULO VII

### DISCUSIÓN

#### 7.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas bimetálicas TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd para *Nocardia brasiliensis*

En el campo de la investigación antibacteriana, las nanopartículas bimetálicas han emergido como una perspectiva prometedora, demostrando propiedades antibacterianas excepcionales contra múltiples cepas bacterianas. En este análisis, centraremos la discusión en los resultados obtenidos de nuestras nanopartículas, mientras situamos estos descubrimientos en el marco de investigaciones previas sobre antibióticos, con el propósito de proporcionar una perspectiva actual en este campo de estudio.

En presente trabajo de investigación, las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (2), TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd han mostrado tener una eficacia antibacteriana sobresaliente, especialmente contra *Nocardia brasiliensis*. Estas nanopartículas registraron una concentración mínima inhibitoria de 2 ppm. En comparación, las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (1) presentaron una CMI ligeramente superior de 3 ppm contra *N. brasiliensis*.

En el caso de *S. aureus*, las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-V demostraron un rendimiento superior, con una CMI de 2 ppm, mientras que las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (1) y TiO<sub>2</sub>-Gd exhibieron una CMI de 4 ppm. Para *E. coli*, todas las

nanopartículas analizadas presentaron una CMI uniforme de 4 ppm. Estos resultados sugieren que, aunque las nanopartículas mantienen una actividad antibacteriana robusta contra *E. coli* y *S. aureus*, son particularmente eficaces contra *N. brasiliensis*.

En estudios previos, se evaluó la actividad antibacteriana de antibióticos como PA-824 y BTZ-043 contra *N. brasiliensis* [50]. PA-824 mostró una eficacia baja con valores de CMI superiores a 64 µg/ml, mientras que BTZ-043 demostró ser significativamente más eficaz con valores de MIC50 de 0.250 µg/ml, respectivamente. Sin embargo, ambos antibióticos exhibieron una eficacia limitada contra *E. coli* y *S. aureus*, con una CMI de  $\geq 64$  µg/ml.

DA-7867, otro antibiótico evaluado en estudios previos destacó por su notable eficacia *in vitro* contra *N. b.*, con valores de CMI sustancialmente más bajos en comparación con otros agentes. Este hallazgo resalta el potencial de DA-7867 como un fármaco antibacteriano altamente eficaz contra *N. brasiliensis* [51]. PBTZ169, un agente antibacteriano adicional evaluado en investigaciones anteriores, también demostró una potente actividad antibacteriana, especialmente contra *N. brasiliensis* con una CIM de 0.0037 µg/ml [52]. Este resultado posiciona a PBTZ169 entre los agentes antibacterianos más eficaces contra esta bacteria, según los datos disponibles.

En contraste, las nanopartículas bimetálicas, en particular TiO<sub>2</sub>-Ag (2), TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd, demostraron ser eficaces contra *N. brasiliensis*, similar a los antibióticos como DA-7867 y PBTZ169 los cuales también han mostrado resultados prometedores en estudios previos [21]. Estos resultados destacan la relevancia del uso de nanopartículas bimetálicas en la búsqueda de nuevos y

mejores antibióticos. Además, destacan la necesidad de continuar explorando diversas opciones terapéuticas para combatir infecciones bacterianas. Cabe destacar que hasta la fecha ninguno de los antibióticos descritos ha mostrado tener un efecto inmunomodulador en el actinomicetoma por *N. brasiliensis* a diferencia de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (2) como se verá más adelante.

## **7.2. Evaluación del efecto citotóxico de las nanopartículas bimetálicas TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd sobre esplenocitos de ratón BALB/c**

La citotoxicidad observada en esplenocitos expuestos a nanopartículas bimetálicas como TiO<sub>2</sub>-Ag (2), TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd , es a nuestro parecer un fenómeno complejo asociado a diversos factores. Algunos de estos factores incluyen la naturaleza de estas nanopartículas (tipo, tamaño, forma y composición), la concentración utilizada y el tiempo de exposición, tal como se ha señalado en estudios previos [53].

En el caso de las nanopartículas TiO<sub>2</sub>-Ag (2), se observó una disminución no significativa dependiente de la concentración en la viabilidad celular comparada con el control positivo durante la primera hora. Sin embargo, a las tres horas de exposición, se evidenció una marcada disminución en la viabilidad celular, especialmente en las concentraciones más altas de 2 ppm y 0.2 ppm. Este patrón sugiere que el tiempo de exposición juega un papel crucial en la determinación de los efectos citotóxicos de estas nanopartículas, un hallazgo que está en consonancia con la literatura existente que destaca la importancia del tamaño, la concentración y el tiempo de exposición en la toxicidad de las nanopartículas [54].

Es importante señalar que, si bien estos resultados indican una citotoxicidad significativa en este ensayo in vitro, es fundamental tener en cuenta que los experimentos se realizaron en un entorno de laboratorio controlado y no en un sistema biológico completo. Esta distinción es relevante, ya que los efectos observados podrían variar en un contexto más complejo, como un modelo animal. Por esta razón, llevamos a cabo un modelo animal de micetoma donde probamos las nanopartículas para evaluar la respuesta a las nanopartículas en un contexto más representativo y complejo.

Por otro lado, las nanopartículas  $\text{TiO}_2\text{-V}$  y  $\text{TiO}_2\text{-Gd}$  manifestaron un efecto citotóxico pronunciado desde la primera hora de exposición, con todas las concentraciones probadas mostrando una reducción significativa en la viabilidad celular. Este efecto se mantuvo e incluso se intensificó a las tres horas de exposición, destacando así la naturaleza altamente citotóxica de estas nanopartículas. Estos resultados son consistentes con estudios previos que han demostrado la capacidad de las nanopartículas metálicas para inducir estrés oxidativo, apoptosis y respuestas inflamatorias en diferentes tipos celulares y tejidos [55], [56].

La generación de ROS y las interacciones con macromoléculas son mecanismos centrales que impulsan la citotoxicidad de las nanopartículas, y la estabilidad de estas nanopartículas, junto con su absorción celular y su estabilidad coloidal, juega un papel crucial en la determinación de su perfil toxicológico [57]. En este sentido, ajustar los atributos de las nanopartículas podría ser una estrategia

viable para mejorar su actividad biológica en el sitio objetivo y al mismo tiempo mitigar los efectos citotóxicos.

Sin embargo, es importante considerar las limitaciones de este experimento al interpretar los resultados. La duración limitada de cuatro horas proporciona una ventana limitada a los efectos de las nanopartículas, oscureciendo potencialmente cualquier respuesta celular retardada o mecanismo de recuperación que pueda surgir después de la exposición. Además, la dependencia exclusiva del azul de tripano para discernir la viabilidad celular introduce posibles sesgos, ya que este método puede no reflejar con precisión los estados matizados de la salud celular, particularmente en el contexto de eventos apoptóticos tempranos o daño celular subletal. Estos factores requieren un enfoque cauteloso al extrapolar los hallazgos, abogando por estudios más amplios y la incorporación de diversos ensayos de viabilidad para desentrañar el impacto integral de estas nanopartículas.

### **7.3. Evaluación del efecto de las nanopartículas bimetálicas TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd sobre el actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*.**

El modelo experimental *in vivo* establecido para evaluar el impacto de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (2) en el actinomicetoma inducido por *Nocardia brasiliensis* ha proporcionado una serie de hallazgos significativos, tanto a nivel clínico como microscópico.

Desde el punto de vista clínico, el grupo tratado con nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (2) presentó características distintas en comparación con el grupo de control. Se observó un área eritematosa y múltiples fístulas en el cojinete plantar del grupo

tratado, en contraste con las lesiones más pálidas, las escaras y la apariencia frágil del grupo de control. Sin embargo, es crucial destacar que, a pesar de estas diferencias visibles, los volúmenes de lesión entre ambos grupos no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Esto subraya la necesidad de realizar investigaciones adicionales para comprender a fondo la verdadera eficacia de las nanopartículas a nivel macroscópico.

A nivel microscópico, las lesiones de ambos grupos exhibieron microarquitecturas radicalmente distintas. El grupo de control mostró la formación típica de microabscesos asociados a los actinomicetomas causados por *N.b.* mientras que el grupo tratado reveló una mayor abundancia de células mononucleares y tejido fibroso. Esto sugiere que las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (2) pueden tener un efecto modulador sobre la respuesta inmune local y los mecanismos de reparación de tejidos, aunque los mecanismos exactos aún no se han dilucidado.

Al comparar estos hallazgos con los resultados histopatológicos de lesiones de actinomicetoma humano producidas por *N.b.* se observa una coherencia notable, especialmente en el grupo de control, cuya apariencia macroscópica y microscópica se alinea estrechamente con las descripciones proporcionadas en la literatura existente [13]. Esto valida la fiabilidad del modelo de ratón para imitar la progresión de la enfermedad humana del actinomicetoma causado por *N. brasiliensis*.

No obstante, la cohorte sometida a tratamiento con nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (2) manifestó una respuesta singular, resaltando de manera significativa la capacidad potencial de estas nanopartículas para actuar como un agente

modulador en los procesos de respuesta inmunológica local y en los mecanismos subyacentes de reparación tisular.

Este potencial efecto inmunomodulador se hizo evidente durante el análisis inmunofenotípico de las poblaciones celulares de ambos grupos, el cual reveló diferencias estadísticamente significativas en las subpoblaciones de linfocitos T, tanto a nivel local en el sitio de la lesión, como a nivel sistémico en el bazo. Se evidenció un incremento en la proporción de linfocitos T CD4+ y una disminución en los linfocitos T CD8+ en el tejido afectado, mientras que en el bazo se observó un patrón inverso. Estos resultados apuntan hacia un efecto inmunomodulador atribuible a las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (2), es necesario resaltar que las variaciones en las subpoblaciones de linfocitos T podrían tener repercusiones la capacidad del sistema inmunológico para enfrentar la infección, lo cual podría resultar tanto en una mejora como en un deterioro de la condición clínica [58].

En trabajos previos, se ha caracterizado la modulación inmunológica ejercida por nanopartículas de plata sobre las células del sistema inmune, evaluando partículas de diversas dimensiones (10, 20 y 40 nm) [59]. En estos, las nanopartículas de Ag de 20 nm demostraron una interacción con distintos tipos celulares, resaltando una asociación significativa con los monocitos y las células dendríticas, elementos cruciales en la presentación de antígenos y la activación subsiguiente de los linfocitos T. Además, se reportó la inducción de citocinas proinflamatorias en respuesta a la exposición a estas nanopartículas. Este perfil de respuesta sugiere que las nanopartículas de plata pueden ejercer un impacto considerable en la modulación de la respuesta inmunitaria, lo que podría explicar

el fenómeno observado en el presente estudio ya que las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (2) coinciden con las dimensiones reportadas.

Cabe destacar que si bien las Np de TiO<sub>2</sub>-Ag (2) parecen tener un efecto inmunomodulador este no repercutió a nivel clínico en el tamaño del micetoma donde no se observó una disminución del volumen. Esto contrasta con los reportado en un estudio previo donde se demostró que cepas atenuadas de *N. brasiliensis* tenían un efecto inmunomodulador similar al obtenido en este trabajo, resultando en una reducción notable del tamaño del actinomicetoma [60].

Adicionalmente, se ha observado que la administración de nanopartículas de plata en un modelo murino experimental de tuberculosis indujo una respuesta inmunomoduladora, caracterizada por una disminución en las citocinas proinflamatorias y una modulación de las respuestas Th2 [61]. Este efecto inmunomodulador se observó de manera principal en el bazo donde se reportó una disminución de linfocitos T CD4+, lo que resulta similar a los efectos observados en nuestro experimento. Dada la cercanía filogenética entre *Nocardia brasiliensis* y *Mycobacterium tuberculosis*, es plausible que la capacidad de las nanopartículas para modular las respuestas de las células T y la producción de citocinas en estas infecciones sea una característica compartida, lo cual podría explicar las alteraciones en las subpoblaciones de linfocitos T y las respuestas inmunitarias observadas en nuestro experimento con micetoma.

Las variaciones observadas en las subpoblaciones de linfocitos T concuerdan con las respuestas inmunomoduladoras ya documentadas para nanopartículas



de tamaños similares, aunque se requieren investigaciones más profundas para esclarecer completamente los mecanismos subyacentes y las implicaciones a largo plazo.

Además de evidenciar un efecto inmunomodulador y a pesar de usar una dilución 1:100 de la CMI de TiO<sub>2</sub>-Ag (2), la eficacia antimicrobiana de las nanopartículas quedó subrayada por una reducción significativa de las colonias bacterianas en el grupo tratado en comparación con el grupo de control. Esto destaca el potencial de las nanopartículas como agente terapéutico en el tratamiento del actinomicetoma. Esto coincide con lo reportado para para las benzotiazinonas PBTZ169 y BTZ043 donde aun usando una fracción de la CMI de dichos fármacos mantenían su efecto antimicrobiano[52] .

En conclusión, si bien las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag (2) han demostrado resultados prometedores en la modulación de la respuesta inmune y la reducción de la carga bacteriana en el actinomicetoma causado por *Nocardia brasiliensis*, es necesaria más investigación para comprender completamente sus mecanismos de acción, optimizar su aplicación y garantizar su seguridad y eficacia en un entorno clínico.

## CAPÍTULO VIII

### CONCLUSIÓN

La hipótesis que planteada al inicio de la investigación sugería que “*Nocardia brasiliensis* es susceptible *in vitro* e *in vivo* a las nanopartículas bimetálicas TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd”. Los resultados han confirmado en gran medida esta hipótesis, demostrando que estas nanopartículas bimetálicas exhiben una significativa actividad antimicrobiana contra tres microorganismos diferentes, destacando su eficacia particularmente contra *Nocardia brasiliensis*, con concentraciones mínimas inhibitorias de solo 2 ppm.

Estos hallazgos respaldan la hipótesis inicial al demostrar que *Nocardia brasiliensis* es susceptible a estas nanopartículas. Sin embargo, durante esta investigación, también identificamos un aspecto crítico relacionado con las nanopartículas TiO<sub>2</sub>-Ag, TiO<sub>2</sub>-V y TiO<sub>2</sub>-Gd: su potencial efecto citotóxico en esplenocitos de ratón BALB/c, el cual depende tanto de la concentración como del tiempo de exposición. Este resultado sugiere que, aunque estas nanopartículas son efectivas contra *Nocardia brasiliensis*, su uso podría estar limitado o requerir precaución debido a su posible toxicidad.

Además, estos resultados contribuyen a ampliar el conocimiento sobre el uso de nanopartículas bimetálicas como agentes antibacterianos y su capacidad para modular la respuesta inmunológica. No obstante, es evidente que se necesitan investigaciones adicionales para comprender completamente los mecanismos

de acción y optimizar su aplicación clínica, especialmente en el contexto del tratamiento del actinomicetoma causado por *N. brasiliensis*.

# CAPÍTULO IX

## PERSPECTIVAS

1. Determinar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas bimetálicas en bacterias resistentes a antibióticos.
2. Evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas por otras metodologías.
3. Evaluar distintas vías de administración de las nanopartículas bimetálicas en el modelo animal.
4. Determinar la farmacocinética y la farmacodinamia de las nanopartículas bimetálicas en el modelo *in vivo*.
5. Iniciar el tratamiento de forma conjunta con el inóculo de *Nocardia brasiliensis*.

## REFERENCIAS

- [1] E. E. Zijlstra, W. W. J. van de Sande, O. Welsh, E. S. Mahgoub, M. Goodfellow, y A. H. Fahal, "Mycetoma: a unique neglected tropical disease", *Lancet Infect. Dis.*, vol. 16, núm. 1, pp. 100–112, ene. 2016, doi: 10.1016/s1473-3099(15)00359-x.
- [2] P. Verma y A. Jha, "Mycetoma: reviewing a neglected disease.", *Clin. Exp. Dermatol.*, vol. 44, núm. 2, pp. 123–129, mar. 2019, doi: 10.1111/ced.13642.
- [3] J. A. Cárdenas-de la Garza *et al.*, "Clinical characteristics and treatment of actinomycetoma in northeast Mexico: A case series", *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 14, núm. 2, pp. 1–14, feb. 2020, doi: 10.1371/journal.pntd.0008123.
- [4] A. H. Fahal, "Mycetoma: a thorn in the flesh.", *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 98, núm. 1, pp. 3–11, ene. 2004, doi: 10.1016/s0035-9203(03)00009-9.
- [5] R. López-Martínez *et al.*, "Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos", *Gac. Med. Mex.*, vol. 149, núm. 5, pp. 586–592, sep. 2013.
- [6] R. Arenas, *Micología Médica Ilustrada.*, 5ª. Mexico: Mc Graw Hill Education, 2014.
- [7] S. Vanegas, R. Franco-Cendejas, A. Cicero, E. López-Jácome, C. Colin, y M. Hernández, "*Nocardia brasiliensis*-associated femorotibial osteomyelitis", *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 20, pp. 63–65, mar. 2014, doi: 10.1016/j.ijid.2013.11.002.
- [8] O. Welsh, L. Vera-Cabrera, y M. C. Salinas-Carmona, "Mycetoma", *Clin. Dermatol.*, 2007, doi: 10.1016/j.clindermatol.2006.05.011.
- [9] W. W. J. van de Sande, E. S. Maghoub, A. H. Fahal, M. Goodfellow, O. Welsh, y E. E. Zijlstra, "The Mycetoma Knowledge Gap: Identification of Research Priorities", *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 8, núm. 3, mar. 2014, doi: 10.1371/journal.pntd.0002667.
- [10] R. Hassan *et al.*, "Modelling the spatial distribution of mycetoma in Sudan.", *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 115, núm. 10, pp. 1144–1152, may 2021, doi: 10.1093/trstmh/trab076.

- [11] D. Emery y D. W. Denning, "The global distribution of actinomycetoma and eumycetoma", *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 14, núm. 9, pp. 1–13, 2020, doi: 10.1371/journal.pntd.0008397.
- [12] L. Vera-Cabrera, M. C. Salinas-Carmona, O. Welsh, y M. A. Rodriguez, "Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*.", *J. Clin. Microbiol.*, vol. 30, núm. 5, pp. 1183–1188, may 1992, doi: 10.1128/jcm.30.5.1183-1188.1992.
- [13] M. C. Salinas-Carmona, "*Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections", *Microbes Infect.*, vol. 2, núm. 11, pp. 1373–1381, sep. 2000, doi: 10.1016/s1286-4579(00)01291-0.
- [14] M. C. Salinas-Carmona, "Actinomycetoma by *Nocardia brasiliensis*: A neglected disease and a surprising laboratory for experimental medicine", *Med. Univ.*, vol. 19, núm. 76, pp. 143–144, jul. 2017, doi: 10.1016/j.rmu.2017.07.001.
- [15] J. M. Solis-Soto, L. E. Quintanilla-Rodriguez, I. Meester, J. C. Segoviano-Ramirez, J. L. Vazquez-Juarez, y M. C. Salinas-Carmona, "*In situ* detection and distribution of inflammatory cytokines during the course of infection with *Nocardia brasiliensis*", *Histol. Histopathol.*, vol. 23, núm. 5, pp. 573–581, may 2008, doi: 10.14670/hh-23.573.
- [16] M. C. Salinas-Carmona, E. Torres-López, A. I. Ramos, A. Licon-Trillo, y D. Gonzalez-Spencer, "Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice.", *Infect. Immun.*, vol. 67, núm. 5, pp. 2428–2432, may 1999, doi: 10.1128/iai.67.5.2428-2432.1999.
- [17] L. Vera-Cabrera, M. A. Rodriguez-Quintanilla, P. Boiron, M. C. Salinas-Carmona, y O. Welsh, "Experimental mycetoma by *Nocardia brasiliensis* in rats", *J. Mycol. Medicale*, vol. 8, pp. 183–187, dic. 1998.
- [18] O. Welsh, M. C. Salinas-Carmona, J. A. Cárdenas-de la Garza, I. M. Rodriguez-Escamilla, y E. Sanchez-Meza, "Current Treatment of Mycetoma", *Curr. Treat. Options Infect. Dis.*, vol. 10, núm. 3, pp. 389–396, may 2018, doi: 10.1007/s40506-018-0171-y.
- [19] P. D. Wortman, "Treatment of a *Nocardia brasiliensis* Mycetoma With Sulfamethoxazole and Trimethoprim, Amikacin, and Amoxicillin and Clavulanate",

*Arch. Dermatol.*, vol. 129, núm. 5, pp. 564–567, may 1993, doi: 10.1001/archderm.1993.01680260032002.

- [20] O. Welsh, E. Saucedo, J. González, y J. Ocampo-Candiani, “Amikacin alone and in combination with trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of actinomycotic mycetoma”, *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 17, núm. 3, pp. 443–448, sep. 1987, doi: 10.1016/s0190-9622(87)70227-8.
- [21] A. Gomez-Flores, O. Welsh, S. Said-Fernández, G. Lozano-Garza, R. E. Tavarez-Alejandro, y L. Vera-Cabrera, “*In Vitro* and *In Vivo* Activities of Antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, núm. 3, pp. 832–837, mar. 2004, doi: 10.1128/aac.48.3.832-837.2004.
- [22] B. A. Brown-Elliott, J. Killingley, S. Vasireddy, L. Bridge, y R. J. Wallace, “*In Vitro* Comparison of Ertapenem, Meropenem, and Imipenem against Isolates of Rapidly Growing *Mycobacteria* and *Nocardia* by Use of Broth Microdilution and Etest”, *J. Clin. Microbiol.*, vol. 54, núm. 6, pp. 1586–1592, jun. 2016, doi: 10.1128/jcm.00298-16.
- [23] O. Welsh, H. M. Al-Abdely, M. C. Salinas-Carmona, y A. H. Fahal, “Mycetoma Medical Therapy”, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 8, núm. 10, oct. 2014, doi: 10.1371/journal.pntd.0003218.
- [24] S. Bakhiet *et al.*, “A holistic approach to the mycetoma management.”, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 12, núm. 5, may 2018, doi: 10.1371/journal.pntd.0006391.
- [25] P. Scolding, A. H. Fahal, y R. R. Yotsu, “Drug therapy for Mycetoma”, *Cochrane Database Syst. Rev.*, núm. 7, jul. 2018, doi: 10.1002/14651858.cd013082.
- [26] S. Valdezate, N. Garrido, G. Carrasco, P. Villalón, M. J. Medina-Pascual, y J. A. Sáez-Nieto, “Resistance gene pool to co-trimoxazole in non-susceptible *Nocardia* strains.”, *Front. Microbiol.*, vol. 6, pp. 376–376, abr. 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.00376.
- [27] V. Khare, P. Gupta, Prashant Gupta, D. Himanshu, y D. Kumar, “Emergence of co-trimoxazole resistant *Nocardia brasiliensis* causing fatal pneumonia.”, *Case Rep.*, vol. 2013, abr. 2013, doi: 10.1136/bcr-2013-009069.
- [28] N. Hounsome *et al.*, “Role of socioeconomic factors in developing mycetoma: Results from a household survey in Sennar State, Sudan”, *PLoS Negl. Trop. Dis.*,

vol. 16, núm. 10, pp. e0010817–e0010817, oct. 2022, doi: 10.1371/journal.pntd.0010817.

- [29] H. H. Musa, T. H. Musa, I. H. Musa, y I. H. Musa, “Global scientific research progress in mycetoma: a bibliometric analysis.”, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, may 2021, doi: 10.1093/trstmh/trab072.
- [30] I. Khan, K. Saeed, y I. Khan, “Nanoparticles: Properties, applications and toxicities”, *Arab. J. Chem.*, vol. 12, núm. 7, pp. 908–931, may 2017, doi: 10.1016/j.arabjc.2017.05.011.
- [31] S. Li *et al.*, “Durable antibacterial and UV-protective Ag/TiO<sub>2</sub> @ fabrics for sustainable biomedical application.”, *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 2593–2606, mar. 2017, doi: 10.2147/ijn.s132035.
- [32] I. Elibe, H. C. Sharndama, G. O. Osondu-Chuka, y O. P. Okeke, “Immunobiology and nanotherapeutics of severe acute respiratory syndrome 2 (SARS-CoV-2): a current update.”, *Infect. Dis.*, vol. 53, núm. 8, pp. 559–580, abr. 2021, doi: 10.1080/23744235.2021.1916071.
- [33] V. Manikandan *et al.*, “Green synthesis of silver oxide nanoparticles and its antibacterial activity against dental pathogens”, *3 Biotech*, vol. 7, núm. 1, pp. 72–72, abr. 2017, doi: 10.1007/s13205-017-0670-4.
- [34] G. A. Martínez-Castañón, N. Niño-Martínez, F. Martínez-Gutierrez, J. R. Martínez-Mendoza, y F. Ruiz, “Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes”, *J. Nanoparticle Res.*, vol. 10, núm. 8, pp. 1343–1348, dic. 2008, doi: 10.1007/s11051-008-9428-6.
- [35] I. E. Mba y E. I. Nweze, “Nanoparticles as therapeutic options for treating multidrug-resistant bacteria: research progress, challenges, and prospects”, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 37, núm. 6, pp. 108–108, may 2021, doi: 10.1007/s11274-021-03070-x.
- [36] C. M. Lappas, “The immunomodulatory effects of titanium dioxide and silver nanoparticles”, *Food Chem. Toxicol.*, vol. 85, pp. 78–83, nov. 2015, doi: 10.1016/j.fct.2015.05.015.



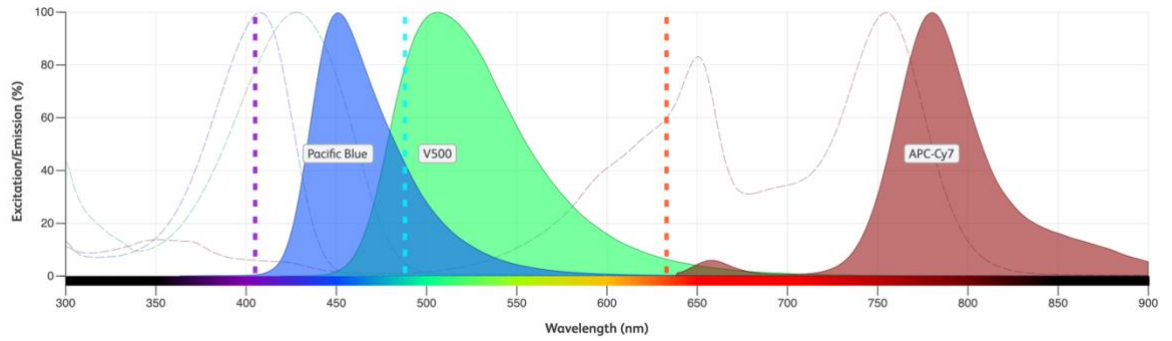
- [37] J. Liu, Z. Liu, Y. Pang, y H. Zhou, "The interaction between nanoparticles and immune system: application in the treatment of inflammatory diseases", *J. Nanobiotechnology*, vol. 20, núm. 1, mar. 2022, doi: 10.1186/s12951-022-01343-7.
- [38] M. Zhu, Y. Li, J. Shi, W. Feng, G. Nie, y Y. Zhao, "Exosomes as extrapulmonary signaling conveyors for nanoparticle-induced systemic immune activation", *Small*, vol. 8, núm. 3, pp. 404–412, feb. 2012, doi: 10.1002/sml.201101708.
- [39] Y. Fu *et al.*, "Systemic Immune Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles after Repeated Intratracheal Instillation in Rat", *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, núm. 4, pp. 6961–6973, abr. 2014, doi: 10.3390/ijms15046961.
- [40] M. Heidary *et al.*, "The Anti-Mycobacterial Activity Of Ag, ZnO, And Ag- ZnO Nanoparticles Against MDR- And XDR-*Mycobacterium tuberculosis*.", *Infect. Drug Resist.*, vol. 12, pp. 3425–3435, nov. 2019, doi: 10.2147/idr.s221408.
- [41] D. N. McMurray, "Mycobacteria and Nocardia", ene. 1996.
- [42] A. Jafari, A. Nagheli, A. A. Foumani, B. Soltani, y R. Goswami, "The Role of Metallic Nanoparticles in Inhibition of *Mycobacterium Tuberculosis* and Enhances Phagosome Maturation into the Infected Macrophage.", *Oman Med. J.*, vol. 35, núm. 6, 2020, doi: 10.5001/omj.2020.78.
- [43] M. G. Correa, F. B. Martínez, C. P. Vidal, C. Streitt, J. Escrig, y C. López-de Dicastillo, "Antimicrobial metal-based nanoparticles: a review on their synthesis, types and antimicrobial action.", *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 11, núm. 1, pp. 1450–1469, 2020, doi: 10.3762/bjnano.11.129.
- [44] S. Gharpure, A. Akash, y B. Ankamwar, "A Review on Antimicrobial Properties of Metal Nanoparticles.", *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 20, núm. 6, pp. 3303–3339, jun. 2020, doi: 10.1166/jnn.2020.17677.
- [45] A. W. Wren, B. M. Adams, D. Pradhan, M. R. Towler, y N. P. Mellott, "Titanium–vanadium oxide nanocomposite thin films: Synthesis, characterization and antibacterial activity", *Mater. Chem. Phys.*, vol. 144, núm. 3, pp. 538–546, abr. 2014, doi: 10.1016/j.matchemphys.2014.01.035.
- [46] V. P. Sur *et al.*, "A Novel Biocompatible Titanium-Gadolinium Quantum Dot as a Bacterial Detecting Agent with High Antibacterial Activity.", *Nanomaterials*, vol. 10, núm. 4, p. 778, abr. 2020, doi: 10.3390/nano10040778.

- [47] G. L. Woods *et al.*, “Susceptibility Testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and Other Aerobic Actinomycetes”, mar. 2011.
- [48] M. L. Gonzalez-Suarez, M. C. Salinas-Carmona, y I. Pérez-Rivera, “IgM but not IgG monoclonal anti-*Nocardia brasiliensis* antibodies confer protection against experimental actinomycetoma in BALB/c mice”, *Fems Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 57, núm. 1, pp. 17–24, oct. 2009, doi: 10.1111/j.1574-695x.2009.00575.x.
- [49] A. A. Miles, S. S. Misra, y J. O. Irwin, “The estimation of the bactericidal power of the blood.”, *J. Hyg. (Lond.)*, vol. 38, núm. 6, pp. 732–749, nov. 1938, doi: 10.1017/s002217240001158x.
- [50] L. Vera-Cabrera, M. P. Campos-Rivera, N. A. Gonzalez-Martinez, J. Ocampo-Candiani, y S. T. Cole, “*In Vitro* Activities of the New Antitubercular Agents PA-824 and BTZ043 against *Nocardia brasiliensis*”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, núm. 7, pp. 3984–3985, jul. 2012, doi: 10.1128/aac.00115-12.
- [51] L. Vera-Cabrera *et al.*, “Therapeutic effect of a novel oxazolidinone, DA-7867, in BALB/c mice infected with *Nocardia brasiliensis*.”, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 2, núm. 9, sep. 2008, doi: 10.1371/journal.pntd.0000289.
- [52] N. A. Gonzalez-Martinez *et al.*, “*In Vivo* Activity of the Benzothiazinones PBTZ169 and BTZ043 against *Nocardia brasiliensis*”, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 9, núm. 10, oct. 2015, doi: 10.1371/journal.pntd.0004022.
- [53] H. I. Labouta, N. Asgarian, K. D. Rinker, y D. T. Cramb, “Meta-Analysis of Nanoparticle Cytotoxicity via Data-Mining the Literature.”, *ACS Nano*, vol. 13, núm. 2, pp. 1583–1594, ene. 2019, doi: 10.1021/acsnano.8b07562.
- [54] M. I. Yousef, A. A. Abuzreda, y M. A. N. Kamel, “Cardiotoxicity and lung toxicity in male rats induced by long-term exposure to iron oxide and silver nanoparticles.”, *Exp. Ther. Med.*, vol. 18, núm. 6, pp. 4329–4339, oct. 2019, doi: 10.3892/etm.2019.8108.
- [55] R. Hu *et al.*, “Molecular mechanism of hippocampal apoptosis of mice following exposure to titanium dioxide nanoparticles”, *J. Hazard. Mater.*, vol. 191, núm. 1, pp. 32–40, jul. 2011, doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.04.027.

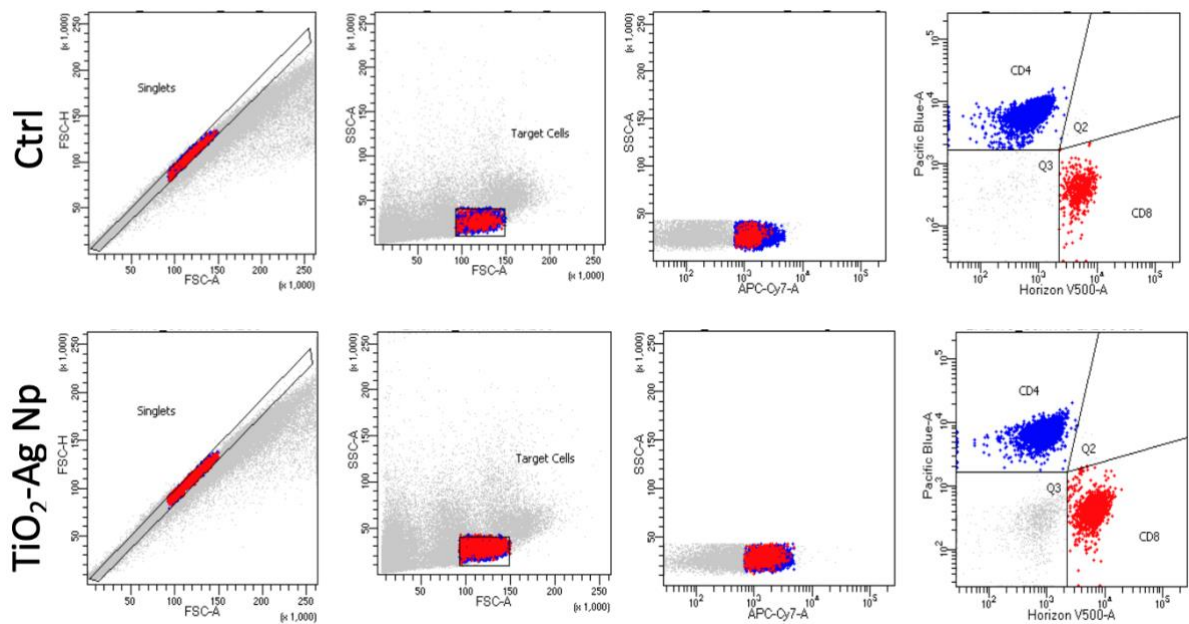
- [56] R. Meena, S. Kumar, y R. Paulraj, "Titanium oxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles in induction of apoptosis and inflammatory response in brain", *J. Nanoparticle Res.*, vol. 17, núm. 1, p. 49, ene. 2015, doi: 10.1007/s11051-015-2868-x.
- [57] Y. Min, G. G. D. Suminda, Y. Heo, M. Kim, M. Ghosh, y Y.-O. Son, "Metal-Based Nanoparticles and Their Relevant Consequences on Cytotoxicity Cascade and Induced Oxidative Stress", *Antioxidants*, 2023, doi: 10.3390/antiox12030703.
- [58] A. Feray *et al.*, "How to Address the Adjuvant Effects of Nanoparticles on the Immune System", *Nanomaterials*, vol. 10, núm. 3, p. 425, feb. 2020, doi: 10.3390/nano10030425.
- [59] J. Bae, M. Ha, H. Perumalsamy, Y. Lee, J. Song, y T. H. Yoon, "Mass Cytometry Exploration of Immunomodulatory Responses of Human Immune Cells Exposed to Silver Nanoparticles", *Pharmaceutics*, vol. 14, núm. 3, pp. 630–630, mar. 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14030630.
- [60] J. A. García-Lozano, C. García-Berlanga, R. Viveros-Rosado, J. Ocampo-Candiani, J. Vargas-Villarreal, y L. Vera-Cabrera, "A novel experimental immunomodulatory therapy against *Nocardia brasiliensis* in a BALB/c murine model.", *Clin. Exp. Dermatol.*, vol. 45, núm. 5, pp. 544–548, ene. 2020, doi: 10.1111/ced.14139.
- [61] O. V. Kalmantaeva, V. V. Firstova, N. S. Grishchenko, T. I. Rudnitskaya, V. D. Potapov, y S. G. Ignatov, "Antibacterial and Immunomodulating Activity of Silver Nanoparticles on Mice Experimental Tuberculosis Model", *Appl. Biochem. Microbiol.*, vol. 56, núm. 2, pp. 226–232, mar. 2020, doi: 10.1134/s0003683820020088.

# ANEXO A

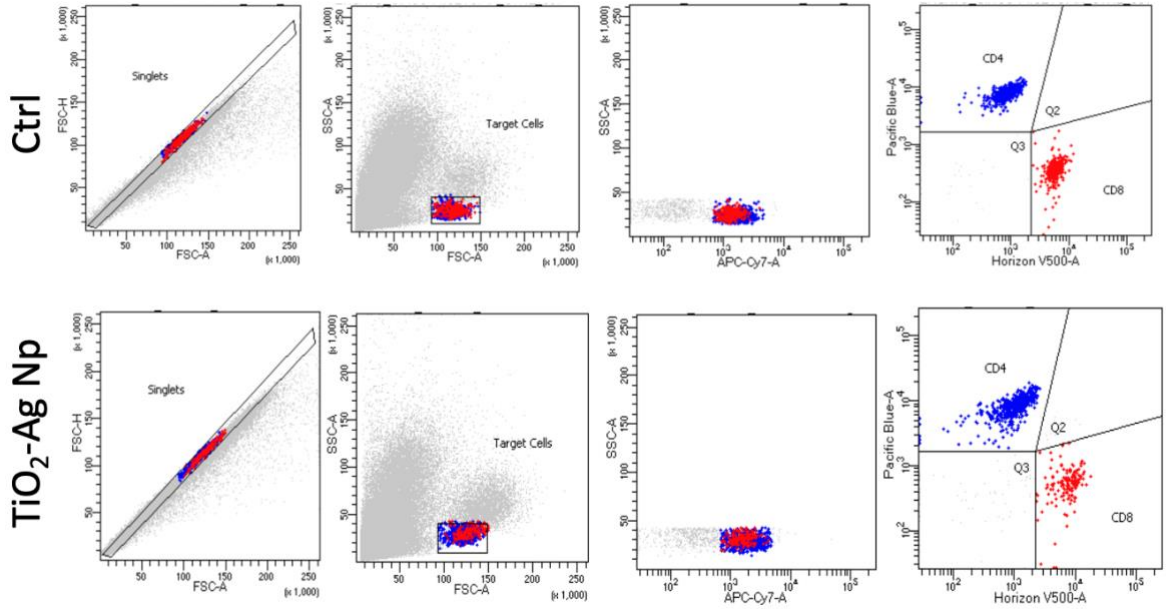
Espectro de absorción de anticuerpos monoclonales utilizados en este trabajo



Estrategia de análisis de citometría de flujo para suspensión celular de bazo



Estrategia de análisis de citometría de flujo para suspensión celular del  
cojinete plantar



## ANEXO B

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

#### Medio de Cultivo BHI:

##### Reactivos:

- 3.7g de medio BHI
- 100 ml de agua destilada

##### Procedimiento:

1. Pesar 3.7 g de medio BHI.
2. Disolver en 100 ml de agua destilada.
3. Dividir en 2 matraces Erlenmeyer de 250 ml.
4. Esterilizar.

#### Medio de Cultivo Müller-Hinton:

##### Reactivos:

- 2.1g de medio Muller-Hinton
- 100 ml de agua destilada

##### Procedimiento:

1. Pesar 2.1 g de medio Muller-Hinton.
2. Disolver en 100 ml de agua destilada.
3. Dividir en 2 matraces Erlenmeyer de 250 ml.
4. Esterilizar.

#### DMSO al 1%:

##### Reactivos:

- 0.5 ml de DMSO
- 49.5 ml de solución salina estéril

##### Procedimiento:

1. Añadir 0.5 ml de DMSO a un contenedor estéril.
2. Añadir 49.5 ml de solución salina estéril.
3. Mezclar bien para asegurar que el DMSO se haya disuelto completamente.
4. Almacenar a 4°Celsius.

#### Medio DMEM Enriquecido:

##### Reactivos:

- 500 ml de Medio de crecimiento DMEM
- 50 ml de FBS inactivado por calor
- 5 ml de Penicilina Estreptomicina (10,000 U/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomicina)

##### Procedimiento:

1. En 500 ml de DMEM, agregar 50 ml de FBS.
2. Agregar 5 ml de Penicilina Estreptomicina.
3. Guardar a 4°C.
4. Esterilizar por filtrado.

#### Buffer de Lisis de Eritrocitos 10X:

##### Reactivos:

- 8.26 g de NH<sub>4</sub>Cl
- 1.19 g de NaHCO<sub>3</sub>
- 200 µL de EDTA [0.5 M, pH 8]

- Agua destilada hasta 100 mL

**Procedimiento:**

1. Pesar  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y  $\text{NaHCO}_3$ .
2. Agregar 200  $\mu\text{L}$  de EDTA.
3. Agregar agua destilada hasta 100 mL.
4. Ajustar pH a 7.3.
5. Esterilizar por filtrado.

**Azul de Tripano al 0.4% 10X:**

**Reactivos:**

- 4 g de Azul de Tripano
- 100 ml de agua destilada

**Procedimiento:**

1. Pesar 4 g de Azul de Tripano.
2. Disolver en 100 ml de agua destilada.
3. Ajustar pH si es necesario.
4. Esterilizar por filtrado.

**Formaldehído al 10%:**

**Reactivos:**

- 10 mL de formaldehído al 37%
- 90 mL de PBS

**Procedimiento:**

1. Agregar 10 mL de formaldehído al 37%.
2. Agregar 90 mL de PBS.
3. Mezclar bien.

**Etanol al 70%:**

**Reactivos:**

- 350 ml de alcohol etílico puro (96-100%)
- 150 ml de agua destilada o estéril

**Procedimiento:**

1. Añadir 350 ml de alcohol etílico a un contenedor estéril.
2. Añadir 150 ml de agua destilada.
3. Mezclar bien.