

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS
ACOPLADOS A NANOPARTÍCULAS DE ORO SOBRE UN MODELO
in vitro DE *Mycobacterium tuberculosis*

POR

Q. B. P. DENISSE PALOMA CAMPA GÓMEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2024

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS
ACOPLADOS A NANOPARTÍCULAS DE ORO SOBRE UN MODELO
in vitro DE *Mycobacterium tuberculosis*

Comité de Tesis

Dra. Lydia G. Rivera Morales
Presidente

Dra. M. Cristina Rodríguez Padilla
Secretaria

Dr. Reyes S. Tamez Guerra
Vocal 1

Dr. Jorge E. Castro Garza
Vocal 2

Dra. Diana G. Zárate Triviño
Vocal 3

Katiushka Arévalo Niño
Subdirectora de Posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS
ACOPLADOS A NANOPARTÍCULAS DE ORO SOBRE UN MODELO
in vitro DE *Mycobacterium tuberculosis*

Dirección de Tesis



Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Directora Interna



Dra. Dulce Adriana Mata Espinosa
Directora Externa

AVISO DE DERECHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por el fondo de apoyo a proyectos de investigación en el campo de la salud de la Secretaría de Salud del INCMNSZ, bajo el nombre “Inmunoterapia y nanotecnología para tratar la tuberculosis drogo-sensible y resistente con productos naturales”. Clave No. CICUAL-PAT-1976-19/21-1



Este trabajo de investigación se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y el Departamento de Patología, sección Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León, mi *alma mater*, por brindarme las herramientas necesarias para mi desarrollo académico y profesional.

Así mismo, agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas por brindarme el conocimiento de calidad que se requiere para desarrollarme en la investigación.

Agradezco al INCMNSZ por abrirnos las puertas y brindarnos el apoyo económico e infraestructural necesario para desarrollar este proyecto.

Agradezco a CONAHCYT por el apoyo económico brindado para obtener mi grado de Maestra en Ciencias (Número de apoyo: 821619).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. M. Cristina Rodríguez Padilla, jefa del departamento de Microbiología e Inmunología, por formar parte de mi comité de tesis y contar con su apoyo.

Agradezco a la Dra. Lydia G. Rivera Morales por brindarme su confianza, cariño, asesoría y sobre todo la gran oportunidad para desenvolverme en la investigación, por hacer todo lo necesario para que mi estancia académica en el INCMNSZ fuera posible y por seguir paso a paso los avances de este proyecto. Por todo el apoyo, GRACIAS.

Agradezco a la Dra. Dulce A. Mata Espinosa por ser mi directora externa, además de acompañarme y transmitirme sus consejos y conocimientos en cada experimento de este proyecto, también agradezco su comprensión, paciencia y el apoyo económico brindado durante toda la estancia académica, GRACIAS.

Agradezco al Dr. Rogelio E. Hernández Pando por aceptar ser mi asesor externo y brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por todo el apoyo, todo el conocimiento transmitido en cada avance experimental y retroalimentación que enriquecieron íntegramente no solo el proyecto, también mis conocimientos, además de dejar siempre nuevas preguntas en las cuales navegar.

Agradezco al Dr. Tonatiuh Melgarejo de Western University of Health Sciences, CA. USA., por la donación de los péptidos antimicrobianos utilizados en este proyecto.

Agradezco a la Dra. Diana G. Zárate Triviño por formar parte de mi comité y por el asesoramiento en la síntesis y caracterización de las nanopartículas obtenidas en este proyecto, así mismo, agradezco al Dr. Reyes S. Tamez Guerra, y el Dr. Jorge E. Castro Garza por formar parte de mi comité y por el apoyo brindado en este proyecto.

Agradezco al Dr. Cristian A. Segura Cerda de CIATEJ, así como al Med. Carlos Sandoval por brindarme su apoyo en dudas y experimentos que formaron parte del proyecto.

Agradezco también a la Dra. Abril Gijsbers Alejandre de la Facultad de Medicina, UNAM, al Q. Miguel Ángel Canseco del Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM y al Dr. José Luis de la Red de Apoyo a la Investigación, UNAM, por brindarme la oportunidad de utilizar los equipos necesarios para terminar la caracterización de las nanopartículas obtenidas en este proyecto.

Por otra parte quiero agradecer al cDr. J. Luis Zacarías Hernández, la Q.B.P. Rocío S. Canizales Treviño, la Lic. Zurisadai Sánchez Cossio, por brindarme su valioso apoyo en el transporte de activos necesarios para este proyecto.

Agradezco a la Med. Yuliana Rojas, el Med. Daniel Garrido, la Lic. Ivonne Méndez, del INCMNSZ, así como a la L.B.G. Ana Cecilia Espinosa, el L.B.G. David Suárez, el M.C. Azael Flores, la L.B.G. Abril Velázquez, la L.B.G. América Espino y la Q.B.P. Ximena Gutiérrez del LIV, FCB, UANL, por alegrar mis días de laboratorio, además de su apoyo y cariño.

Por último, quiero agradecer a las personas que siempre han estado ahí para mí, apoyándome incondicionalmente, incluyendo este proyecto. Mis padres, Rosalba Gómez y Rogelio Campa, mi hermana Marla Campa y mis mejores amigos: Ana Durán, Carolina Campos, Zurisadai Sánchez, Galilea Valdez, Cecilia Muñiz, Xiomara Maldonado, Luis Zacarías y especialmente a Rocío Canizales; por su amor, amistad, pláticas y apoyo, GRACIAS.

DEDICATORIA

A mi familia

Rosalba, Rogelio, Marla, Jovanny, Ever y Bárbara, ya que ustedes cimentaron en gran medida las bases de cada paso que he dado y me han acompañado con firmeza en cada uno de ellos.

A todo aquel que lea este proyecto

“Que encuentre inspiración entre líneas, se cuestione, imagine y disfrute tanto como yo lo hice, a lo largo de su elaboración.”

(Campa-Gómez, 2022)

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	IV
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Tuberculosis	4
2.1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
2.1.1.1 Morfología de <i>M. tuberculosis</i>	5
2.1.2 Tuberculosis pulmonar.....	7
2.1.3 Tuberculosis Extrapulmonar	9
2.1.4 Granuloma	9
2.2 Diagnóstico de <i>M. tuberculosis</i>	10
2.2.1 Microscopía	10
2.2.2 Cultivo sólido y líquido.....	11
2.2.3 Identificación.....	11
2.2.3.1 Pruebas moleculares.....	11
2.2.3.1.1 Xpert MTB/RIF.....	11
2.2.3.2 Diagnóstico inmunológico.....	12
2.2.3.2.1 Detección de antígenos.....	12
2.2.3.2.2 Prueba Cutánea TST.....	12
2.2.3.3 Ensayos de liberación de interferón gamma (IFN- γ).....	12
2.3 Respuesta Inmune en la tuberculosis pulmonar.....	13
2.4 Péptidos antimicrobianos	16
2.4.1 Catelicidinas	18

2.4.1.1 Estructura y mecanismo de acción.....	18
2.4.3.1 Catelicidina proveniente de Búfalo de Agua.....	20
2.4.3.2 Catelicidina proveniente de Canino.....	20
2.5 Nanotecnología aplicada a medicina	22
2.5.1 Nanopartículas de oro	22
2.5.1.1 Actividad antibacteriana.....	23
2.5.1.2 Nanopartículas de oro reducidas con quitosano.....	23
2.5.1.2.1 Actividad antibacteriana.....	25
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS	28
5.1 Objetivo general	28
5.2 Objetivos específicos	28
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29
7. MATERIAL Y MÉTODOS	30
7.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas de oro.....	30
7.1.1 Obtención de las nanopartículas	30
7.1.2 Caracterización de las nanopartículas obtenidas	30
7.1.2.1 UV-Vis (PRS)	30
7.1.2.2 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)	31
7.1.2.2.1 Tamaño.....	31
7.1.2.2.2 Potencial Z	31
7.2 Ensayos <i>in Vitro</i>	31
7.2.1 Ensayos en las líneas celulares MH-S y A549	32
7.2.1.1 Descongelamiento de las líneas celulares.....	32
7.2.1.2 Conteo celular	32
7.2.1.3 Citotoxicidad en líneas celulares MH-S y A549	32
7.2.2 Ensayos sobre cepas bacterianas de Mtb H37Rv y CIBIN99.....	33
7.2.2.1 Descongelamiento de cepas de Mtb	33
7.2.2.2 Conteo de las células bacterianas	33

7.2.2.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de las partículas sobre las cepas de Mtb	34
7.2.3 Captación de las nanopartículas por parte de macrófagos.....	35
7.2.4 Ensayos sobre células MH-S infectadas con cepas de Mtb	36
7.2.3.1 Bacteriólisis (Killing)	36
7.2.3.1.1 Obtención de sobrenadantes para cuantificación de TNF por ELISA	37
7.2.3.1.2 Cuantificación de TNF por ELISA.....	37
8. RESULTADOS	39
8.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas de oro	38
8.1.1 Obtención de las Nanopartículas	38
8.1.2 PRS	39
8.1.3 Tamaño, Potencial Z y PDI	41
8.2 Determinación de la viabilidad celular	43
8.2.1 Viabilidad de MH-S	43
8.2.2 Viabilidad de A549	43
8.3 Determinación de la CMI	44
8.4 Captación de nanopartículas por MH-S.....	48
8.5 Killing	52
8.6 Expresión de TNF producidas en Killing	53
9. DISCUSIÓN	54
10. CONCLUSIÓN	59
11. PERSPECTIVAS	60
12. BIBLIOGRAFÍA	61
13. ANEXOS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.	Título	Página
1	<i>M. tuberculosis</i> en medio Löwenstein-Jensen.	5
2	Componentes y dimensión de la membrana celular de Mtb.	6
3	Vías respiratorias: el viaje de Mtb al sitio de infección.	7
4	Componentes celulares del granuloma formado en infecciones por Mtb.	10
5	Respuesta inmune innata contra Mtb.	14
6	Respuesta inmune adaptativa contra Mtb.	16
7	Péptidos antimicrobianos en la naturaleza.	17
8	Estructura de catelicidina LL-37.	19
9	Mecanismos hipotéticos de acción de las catelicidinas.	19
10	Micrografías representativas de Mtb H37Rv expuestas WBCATH.	21
11	Micrografías representativas de Mtb H37Rv expuestas a K9CATH.	21
12	Clasificación de nanopartículas en el campo médico.	22
13	Diagrama teórico esquemático de la producción de nanopartículas de oro reducidas con quitosano y cargadas con insulina.	23
14	Estrategia experimental del proyecto.	28
15	Esquema de la distribución de las concentraciones de partícula a evaluar y controles.	33
16	Nanopartículas obtenidas a partir de la modificación del método Turkevich.	37
17	Plasmón de Resonancia Superficial (PRS) de las nanopartículas control.	38
18	Plasmón de Resonancia Superficial (PRS) de las nanopartículas con WBCATH.	38
19	Plasmón de Resonancia Superficial (PRS) de las nanopartículas con K9CATH.	39
20	Porcentaje de viabilidad de macrófagos alveolares.	41

21	Porcentaje de viabilidad de neumocitos tipo II.	41
22	Ensayo de viabilidad de las cepas de Mtb expuestas a diferentes concentraciones de las nanopartículas.	42
23	UFC/mL contadas en los pocillos seleccionados de la figura 23A.	43
24	UFC/mL contadas en los pocillos seleccionados de la figura 23B.	43
25	Micrografías de macrófagos expuestos a nuestras nanopartículas en una simulación de infección con H37Rv por 3 horas incubados a 37°C y 5% de CO ₂	46
26	Micrografías de macrófagos expuestos a nuestras nanopartículas en una simulación de infección con H37Rv incubados por 3 horas a 4°C.	47
27	Micrografías de macrófagos expuestos a nuestras nanopartículas en una simulación de infección con MDR incubados por 3 h a 37°C y 5% de CO ₂	48
28	Micrografías de macrófagos expuestos a nuestras nanopartículas en una simulación de infección con MDR incubados por 3 h a 4°C.	49
29	Evaluación de la carga bacteriana de la cepa H37Rv en macrófagos alveolares tratados con las nanopartículas.	50
30	Evaluación de la carga bacteriana de la cepa MDR en macrófagos alveolares tratados con las nanopartículas.	50
31	Gráficas de absorbancia obtenida a 450 nm. por el ensayo ELISA para TNF de ratón.	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.	Título	Página
1	Características de las nanopartículas de oro control en diferentes días.	39
2	Características de las nanopartículas de oro con WBCATH en diferentes días.	40
3	Características de las nanopartículas de oro con K9CATH en diferentes días.	40

ABREVIATURAS

Abreviatura y/o

símbolo

Descripción

TB	Tuberculosis
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
SI	Sistema Inmune
MDR	Multidrogoresistente
PAM	Péptidos Antimicrobianos
APC	Células Presentadoras de Antígeno Profesionales
MRT	Macrófagos Residentes de Tejido
CD	Células Dendríticas
PRR	Receptores de Reconocimiento de Patrones
TLR	Receptor Tipo Toll
MR	Receptor de Manosa
ICAM	Molécula de Adhesión Intracelular
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas de doble Sándwich
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
TST	Prueba Cutánea de la Tuberculina
IFN-γ	Interferón Gamma
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
NK	Natural Killer
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
TCR	Receptor de Células T
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos
MH-S	Línea celular de macrófagos alveolares murinos
A549	Línea celular de neumocitos humanos tipo II

Tregs	Linfocitos T Reguladores
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
PAMP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
WBCATH	Catelicidina de Búfalo de Agua
K9CATH	Catelicidina de Canino
Nps	Nanopartículas
AuNps	Nanopartículas de oro
AuWBNps	Nanopartículas de oro con WB
AuK9Nps	Nanopartículas de oro con K9
AuCatNps	Nanopartículas de oro con K9 o WB
LMW	Low Molecular Weight (Bajo Peso Molecular)
PRS	Plasmón de Resonancia Superficial
DLS	Dispersión de Luz Dinámica
HAuCl₄	Ácido Cloroáurico
mL	mililitro
nm	nanómetro
µg	microgramo
µL	microlitro
mM	milimolar
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CO₂	Dióxido de Carbono
PBS	Solución Salina Tamponada con Fosfato
SFB	Suero Fetal Bovino
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
°C	Grados centígrados
rpm	revoluciones por minuto
DO	Densidad Óptica
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
CS	Chamber slides (cámaras sobre portaobjetos)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
FITC	Isotiocionato de Fluoresceína

SDS Dodecilsulfato Sódico
BSA Albúmina Sérica Bovina

RESUMEN

La tuberculosis es la segunda causa de muerte por un agente infeccioso en el mundo, es una enfermedad curable pero su tratamiento es agresivo y prolongado. Esto ocasiona que los pacientes abandonen el tratamiento y surjan cepas multidrogaresistentes. Los péptidos antimicrobianos son moléculas que contienen entre 12 y 60 aminoácidos y son parte de la respuesta inmune innata. Han sido evaluados como alternativa para el tratamiento de infecciones, sin embargo, tienen una vida media corta. Por ello, se buscan estrategias que prolonguen su vida media y por lo tanto su actividad antimicrobiana. Las nanopartículas actúan como portadoras de moléculas activas, mejorando su estabilidad, biodisponibilidad y eficacia. En este proyecto desarrollamos nanopartículas de oro reducidas con un complejo de quitosano-péptidos antimicrobianos por una modificación del método Turkevich. Las nanopartículas obtenidas demostraron plasmones de resonancia superficial con picos de longitud de onda entre 520 a 533 nm, tamaños promedio desde los 64 hasta 125 nm y potenciales Z desde 26 hasta 46 mV. En las evaluaciones *in vitro* se determinó que nuestras nanopartículas no son citotóxicas en concentraciones menores a 80 µg/mL - 0.125 mM, mientras que tiene una CMI contra *Mycobacterium tuberculosis* de 11.26 µg/mL - 0.017 mM para la cepa H37Rv y de 45.71 µg/mL - 0.068 mM para la cepa multidrogaresistente CIBIN99. Nuestros resultados mostraron que las nanopartículas se internalizaron en macrófagos alveolares y que la carga bacteriana de ambas cepas se reduce significativamente en macrófagos alveolares infectados a las 24, 48 y 72 h de tratamiento, pero no observamos diferencias significativas en la producción de TNF.

ABSTRACT

Tuberculosis is the second leading cause of death by an infectious agent worldwide. It is a curable disease, but its treatment is aggressive and prolonged. This often leads to patients abandoning treatment, resulting in the emergence of multidrug-resistant strains. Antimicrobial peptides are molecules containing between 12 and 60 amino acids and are part of the innate immune response. They have been evaluated as an alternative for treating infections; however, they have a short half-life. Therefore, strategies are being sought to extend their half-life and thus their antimicrobial activity. Nanoparticles act as carriers of active molecules, improving their stability, bioavailability, and efficacy. In this project, we developed gold nanoparticles reduced with a chitosan-antimicrobial peptide complex using a modified Turkevich method. The nanoparticles obtained showed surface plasmon resonances with peak wavelengths ranging from 520 to 533 nm, average sizes ranging from 64 to 125 nm, and Z potentials ranging from 26 to 46 mV. *In vitro* evaluations determined that our nanoparticles are non-cytotoxic at concentrations below 80 µg/mL - 0.125 mM, while they exhibit a MIC against *Mycobacterium tuberculosis* of 11.26 µg/mL - 0.017 mM for the H37Rv strain and 45.71 µg/mL - 0.068 mM for the multidrug-resistant CIBIN99 strain. Our results showed that the nanoparticles were internalized by alveolar macrophages. The bacterial load of both strains was significantly reduced in infected alveolar macrophages at 24, 48, and 72 h of treatment, but we did not observe significant differences in TNF production.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades más antiguas conocidas y que ha cobrado más vidas que cualquier otra enfermedad infecciosa a lo largo de la historia del ser humano (Fernandes et al. 2022). Esta patología, causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), produce diez millones de nuevos casos y 1.5 millones de muertes (OMS, 2020) al año en todo el mundo. En la actualidad, es la segunda causa de muerte por un agente infeccioso después del Virus SARS-CoV-2 (OMS, 2024). La TB se encuentra fuertemente relacionada en coinfecciones debido a la inmunodepresión de los pacientes infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana(VIH) (OMS, 2023).

En 2020, el número de casos de TB se redujo un 18% debido al uso de mascarillas y al distanciamiento social, sin embargo, la cifra de muertes en el 2022 (1.5 millones) fue comparable con la cifra registrada por el agente causal de COVID-19 (1.8) (Dheda et al. 2022) y por la reportada anualmente por la OMS previo a la pandemia.

Mtb es un bacilo que se replica dentro de células eucariotas. Infecta principalmente a macrófagos residentes de tejido, los cuales son permisivos a infecciones, pues la eliminación de patógenos no es una de sus funciones principales. Además, Mtb tiene la capacidad de inhibir los procesos de apoptosis y autofagia en las células infectadas (Zhai et al. 2019). El mayor número de infecciones causadas por Mtb afectan las vías respiratorias debido a su transmisión por bioaerosoles a personas con contacto cercano y prolongado, sin embargo puede producir infecciones extrapulmonares en diferentes órganos del cuerpo, como en riñones, cerebro, columna vertebral, entre otros (Fontecha et al. 2009; Bussi y Gutierrez, 2019).

Mtb ha coevolucionado con los humanos durante milenios, por lo que se encuentra bien adaptado para coexistir con el sistema inmune (SI) humano, de tal manera que su ciclo celular depende directamente de esta interacción y el bacilo evade de manera profesional la respuesta inmune innata y persiste a la respuesta inmune adaptativa sin causar

sintomatología ni provocar patologías tisulares, por lo que las personas infectadas pueden coexistir con el bacilo por años sin darse cuenta (Chandra et al. 2022).

La tuberculosis es curable con el tratamiento de antibióticos adecuado. Sin embargo, es un tratamiento largo y con efectos adversos. Esto ocasiona el abandono frecuente de los medicamentos favoreciendo la aparición de cepas resistentes a los fármacos y por lo tanto haciendo ineficaces los tratamientos. Debido a ello, se han propuesto estrategias alternativas para el control de la infección, tales como el uso de moléculas con propiedades antimicrobianas provenientes de plantas (Jiménez-Arellanes et al. 2013); moléculas que estimulen la respuesta inmune innata como los péptidos antimicrobianos (PAM) y la administración exógena de PAM obtenidos de forma sintética (Rivas-Santiago et al. 2011). Todo ello con la finalidad de reducir la carga bacteriana en periodos cortos de tiempo.

Los PAM existen en la naturaleza en una amplia variedad de formas. Se han descrito en hongos, plantas y animales, incluyendo el ser humano. Son componentes de la inmunidad innata y tienen la ventaja sobre los antibióticos convencionales por su actividad antibiofilm de amplio espectro, , capacidad inmunomoduladora, además de reducir la aparición de cepas resistentes a antibióticos (Magana et al. 2020). Los PAM son mayormente de estructura α -helicoidal, catiónicos y anfifílicos. El mecanismo de acción más conocido consta de permeabilizar la membrana bacteriana, provocando un cambio del potencial electroquímico que conduce a la destrucción morfológica y muerte celular bacteriana (Lei et al. 2019).

Los PAM representan un potencial agente terapéutico frente a distintas infecciones, sin embargo, por su naturaleza, son poco estables, fácilmente degradados por enzimas proteolíticas, de vida media corta y tóxicos a concentraciones relativamente altas (Lei et al. 2019; Magana et al. 2020). Por ello existe el interés en desarrollar nuevas estrategias que superen estos inconvenientes y que los PAM tengan aplicaciones clínicas.

Una de las estrategias más innovadoras para contrarrestar estas desventajas y eficientizar la administración de nuevos fármacos o moléculas es el desarrollo de complejos nanométricos capaces de acarrear cualquier molécula. Dentro de los nanomateriales más utilizados en nanomedicina se encuentran las nanopartículas (Nps) de oro (AuNps) por su baja toxicidad y compatibilidad con sistemas biológicos. Estas nanoestructuras ya se han aplicado en biomedicina desde sus primeras síntesis coloidales hace más de tres siglos (Alkilani et. Al. 2009).

2. ANTECEDENTES

2.1 Tuberculosis

La TB es una de las enfermedades más antiguas asociada a la especie humana, siendo una de las principales causas de muerte por agente infeccioso. Su mayor prevalencia, es en regiones con un nivel socioeconómico bajo (Natarajan et al. 2020). Ha causado la mayor cantidad de muertes por un agente infeccioso en la historia humana (Chandra et al. 2022). Afecta principalmente pulmones pero se puede encontrar infectando otras partes del cuerpo, conociéndose como tuberculosis extrapulmonar (Khan et al. 2019). Se transmite casi exclusivamente de persona a persona por medio de bioaerosoles en forma de gotitas que van desde los 0.65 hasta 7.0 μm de diámetro, conteniendo menos de 10 bacilos, la cual es la dosis mínima infectiva por inhalación en el ser humano (Bussi y Gutierrez, 2019). Se estima que un cuarto de la población mundial posee esta enfermedad, sin embargo, no todas las personas infectadas presentan síntomas, ya que *M. tuberculosis* (Mtb) el agente causal, ha coevolucionado con el humano permitiéndole sobrevivir en el hospedero por décadas, evadiendo la respuesta inmune. La infección asintomática de TB se denomina tuberculosis latente. (Chandra et al. 2022).

Se estima que en el 2020, 9,9 millones de personas contrajeron TB, un total de 1.5 millones de personas murieron, de las cuales, el 14.3% presentaban coinfección con VIH. En la actualidad se estima que 1 de cada 3 personas ha estado en contacto con el bacilo y aunque la cifra de personas que porta Mtb es muy alta, solo entre el 5 y 10% desarrolla tuberculosis activa, manifestando síntomas leves como fiebre, tos, pérdida de peso, etc., durante muchos meses, lo que retrasa al portador en buscar ayuda médica, lo que contribuye en la propagación de la enfermedad y contribuye al aumento de los casos reportados cada año (OMS, 2021). Según el boletín epidemiológico de la Secretaría de Salud, en México hasta la semana 34 de 2024 se han reportado 14,236 casos de tuberculosis respiratoria, 381 casos de meningitis tuberculosa y 2,802 casos de otras formas de TB. Aproximadamente el 45% de personas con TB activa sin tratamiento

mueren y prácticamente la totalidad de personas coinfectadas con VIH-TB mueren (OMS, 2021).

2.1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis es el agente causal de la TB, es un bacilo ácido-alcohol resistente descrito por primera vez en 1882 por Robert Koch. Bajo el microscopio se puede observar de diferentes morfologías y tamaños dependiendo de las condiciones de cultivo.

2.1.1.1 Morfología de *M. tuberculosis*

Dimensionalmente el bacilo puede medir desde 1 hasta 10 μm de largo encontrándolo más comúnmente entre 3 a 5 μm y 0.2 a 0.6 μm de ancho. Bajo condiciones de estrés pueden tomar una apariencia hinchada y ovoide. En cultivos viejos se observan como bacilos cortos, mientras que dentro de macrófagos se observan con morfología ramificada. Las cepas multidrogasresistentes (MDR) pueden producir brotes y ramificaciones (Velayati y Farnia, 2012). En cuanto a la morfología colonial de *M. tuberculosis* en medio Löwenstein-Jensen, 7H10 y 7H11, se observan colonias de color crema, rugosas y elevadas después de 2 a 3 semanas de inoculación (fig 1) (Velayati, 2016).



Fig 1. *M. tuberculosis* en medio Löwenstein-Jensen (Velayati, 2016).

Las técnicas microscópicas han sido fundamentales para observar diferentes estructuras celulares de Mtb, se le conoce como un bacilo de baja permeabilidad debido a la complejidad estructural de su membrana plasmática, la cual está compuesta por cuatro capas: pared celular, complejo peptidoglicano-arabinogalactano, al que se le une covalentemente la micomembrana, seguida de la cápsula externa, compuesta

predominantemente de α -glucano, molécula responsable de mediar las interacciones con fagocitos para favorecer la proliferación bacteriana. (fig. 2), por otra parte, Mtb presenta porinas encargadas de evitar el paso de moléculas grandes al interior de la célula y descargar agentes tóxicos, por lo que juegan un papel importante en la patogenicidad y se consideran blancos terapéuticos en la actualidad (Kalscheuer et al. 2019; Velayati, 2016).

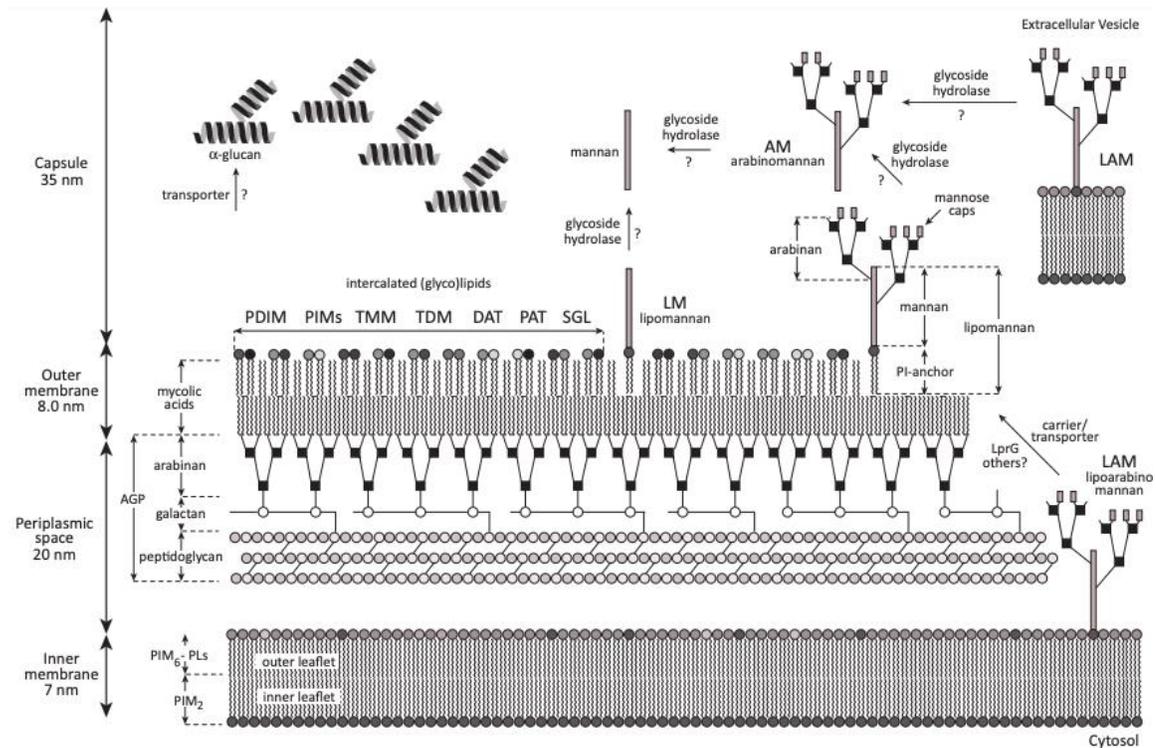


Fig 2. Componentes y dimensión de la pared celular de *M. tuberculosis*. Se observan las cuatro diferentes capas. La membrana externa está conformada por glicolípidos y lipoglicanos, lipomannano, lipoarabinomannano, diferentes proteínas y lipoproteínas (Kalscheuer et al. 2019).

2.1.2 Tuberculosis pulmonar

La TB pulmonar representa un 85% de los casos totales del TB en todo el mundo (Rolo et al. 2023). Una persona contrae *M. tuberculosis* a través de gotas micrométricas expedidas por un portador, una vez que se inhalan, los bacilos se encuentran con la mucosa a lo largo de las vías respiratorias (figura 3). Mtb es capaz de habitar en diferentes células, incluyendo células presentadoras de antígeno profesionales (APC), como macrófagos

residentes de tejido (MRT), células dendríticas (CD), neutrófilos y monocitos (Ernst, 2012; Lerner et al. 2015). Cuando el SI detecta que las células se encuentran infectadas por *Mtb*, comienza el reclutamiento de diversas células de la inmunidad innata, las cuales se infectan al llegar al sitio de reclutamiento (figura 3C), el ambiente proinflamatorio promueve el establecimiento de granulomas tempranos, que se desarrollan en al menos el 90% de las personas infectadas, mecanismo asociado a infecciones latentes, también

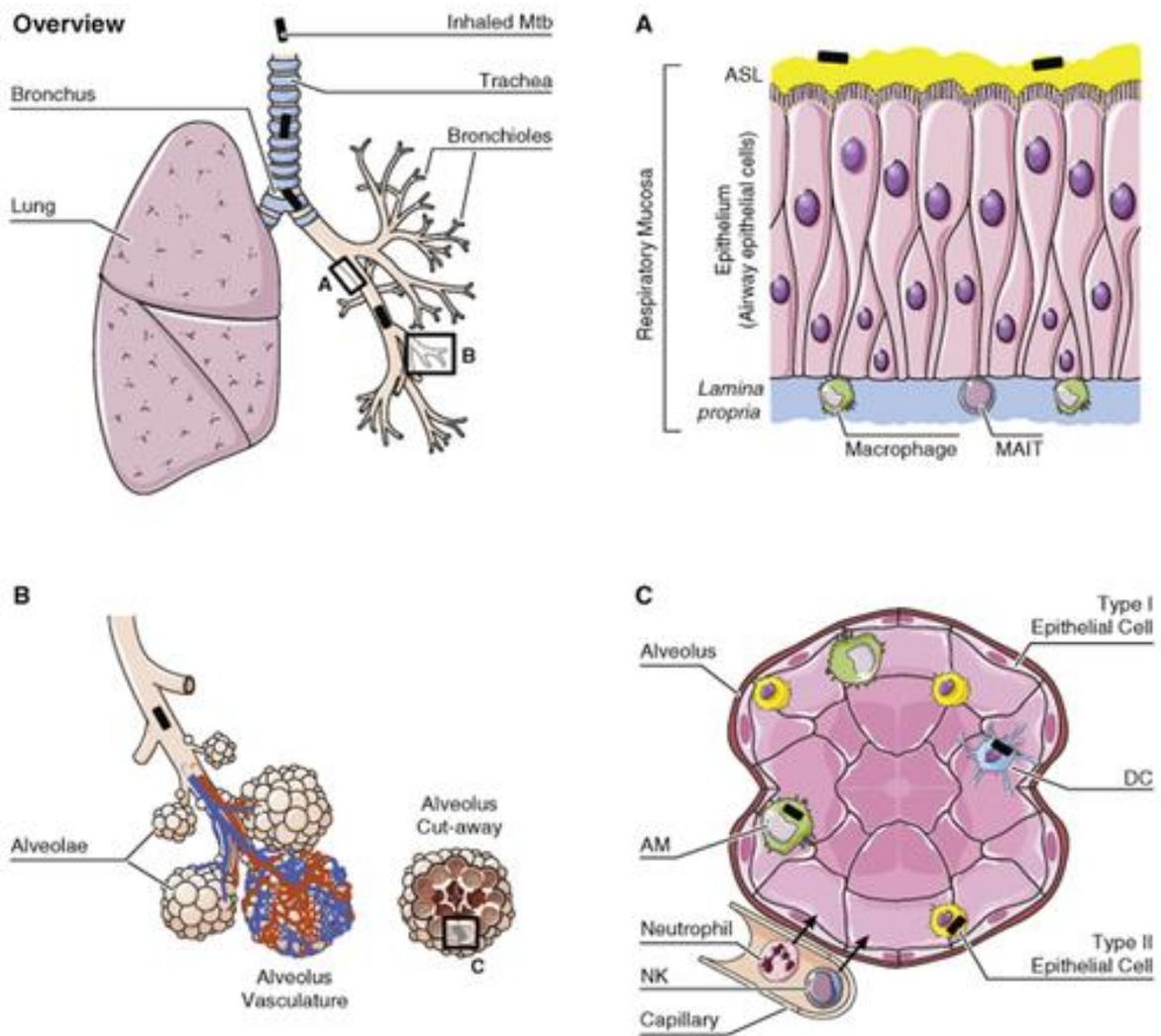


Fig 3. Vías respiratorias: el viaje de *M. tuberculosis* al sitio de infección (Lerner et al. 2015). A) *M. tuberculosis* en mucosa respiratoria. B) *M. tuberculosis* viajando a los alvéolos. C) *M. tuberculosis* dentro de un alvéolo, en donde las células epiteliales del tipo II secretan moléculas antimicrobianas. Es aquí en donde la bacteria se encuentra con los macrófagos residentes de tejido (MRT) o células dendríticas (CD) y recluta a otras células del sistema innato para combatir la infección (Lerner et al. 2015).

conocido como fase de persistencia no replicante, sin embargo, en este punto el portador es capaz de contagiar (De Martino et al. 2019).

Las primeras células en entrar en contacto con *M. tuberculosis* son las células epiteliales (figura 3A) que reconocen al patógeno por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como el receptor tipo toll (TLR) 2 capaz de reconocer a más de 90 lipoproteínas distintas de la micobacteria como el lipomano y fosfatidil inositol, mientras que el TLR-9 reconoce ADN bacteriano (Ernst, 2012), ambos son capaces de iniciar respuestas inmunes innatas produciendo citocinas proinflamatorias que contribuyen a la activación del sistema inmune (De Martino et al. 2019). Como se mencionó anteriormente, la cápsula bacteriana tiene un rol importante en la patogenicidad, diversas bacterias han desarrollado estrategias para sobrevivir y persistir dentro de fagocitos, parte de esta estrategia depende del contacto inicial bacteria-célula blanco. Los primeros estudios de esta interacción demostraron que Mtb restringe la fusión fagolisosomal una vez que se opsoniza antes de ser fagocitada y que la internalización directa por el fagocito contribuye a la supervivencia de la bacteria, existen diversas células con la capacidad de internalizar a la bacteria directamente o posterior a la opsonización, como los MRT alveolares, CD o fagocitos no profesionales como las células epiteliales, esto a través de diversos PRR, como el receptor de manosa (MR) no opsónico, expresado en macrófagos y CD, los receptores del complemento CR1 (CD35), CR2 (CD21), CR3 (CD11b/18) y CR4 (CD11c/CD18), el receptor de proteína surfactante A, expresado en células alveolares, molécula de adhesión intracelular (ICAM) de CD, receptores Fc, entre otros (Kalscheuer et al. 2019; Moliva et al. 2019; Lukácsi et al. 2020). El ambiente proinflamatorio que se genera en esta primera respuesta innata es favorable para el patógeno, ya que atrae más células a su alrededor a las cuales puede seguir infectando para diseminarse y proliferar; así mismo, el proceso inflamatorio es necesario para que se monte la respuesta inmune adaptativa (Ernst, 2012).

2.1.3 Tuberculosis Extrapulmonar

Se le conoce como TB extrapulmonar cuando la micobacteria afecta cualquier otra parte del cuerpo que no sean los pulmones (Rolo et al. 2023), aproximadamente el 16% de los casos de TB son extrapulmonares y pueden manifestarse como meningitis, pleuritis, pericarditis, peritonitis, linfadenitis, infecciones oculares, orales, cutáneas, musculoesqueléticas, abdominales y genitourinarias (Gopaldaswamy et al. 2021) siendo la infección en ganglios linfáticos y la pleura los sitios anatómicos más frecuentes de la TB extrapulmonar (Rolo et al. 2023). Los principales factores de riesgo de la TB extrapulmonar son la edad (<15 años, >65 años), sexo masculino, inmunosupresión o estancias/migraciones de personas que se encuentran o viajaron a países con alta incidencia de TB (Pang et al. 2019).

2.1.4 Granuloma

La infección de las células por Mtb, induce la producción y secreción de quimiocinas que reclutan más células inmunes que también llegan a ser infectadas. Esto produce una acumulación celular, predominantemente de macrófagos para dar lugar a la formación del granuloma (figura 4), el cual es el sello distintivo de la infección. Los granulomas son estructuras compuestas por macrófagos infectados y no infectados, células epiteliales, linfocitos B, T y fibroblastos (Guiradoy y Schlesinger, 2013; Bhattacharya et al. 2021). La función principal del granuloma es contener al microorganismo para concentrar la respuesta inmunitaria en una zona delimitada, sin embargo, Mtb es capaz de resistir a esta respuesta dentro del granuloma, para después reactivarse y/o escapar bajo ciertas condiciones (Bhattacharya et al. 2021).

Estos granulomas no son exclusivos de ciertos tejidos, pueden formarse en cualquier parte del cuerpo en donde se detecte a la bacteria y por ello, histológicamente se pueden

observar diferentes tipos de granulomas dependiendo de los factores de crecimiento y citocinas presentes (Guiradoy y Schlesinger, 2013).

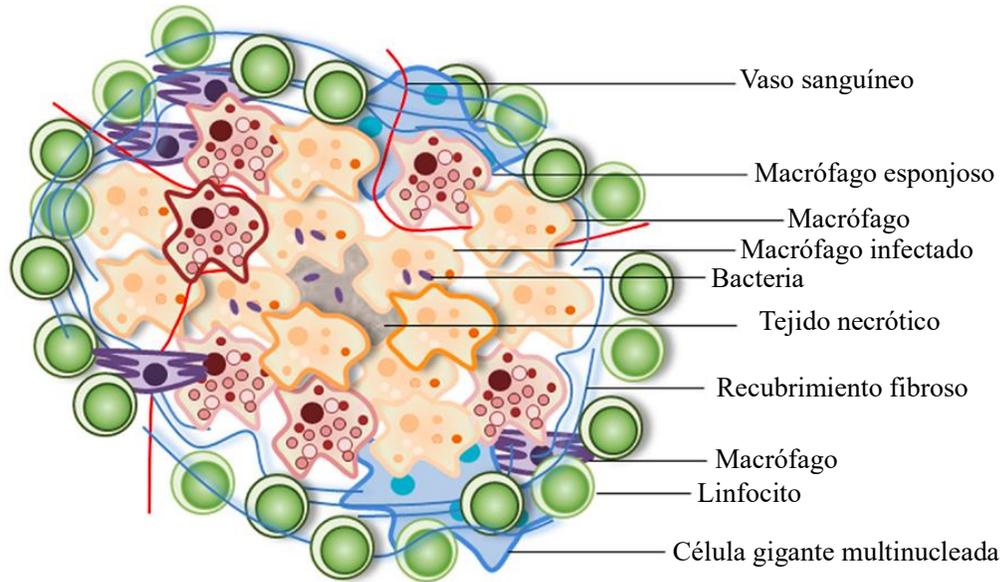


Fig 4. Componentes celulares del granuloma formado en infecciones por *M. tuberculosis* (Guiradoy y Schlesinger 2016).

2.2 Diagnóstico de *M. tuberculosis*

En 2015 la Organización Mundial de la Salud (OMS) recalcó el papel esencial de las técnicas para la detección temprana, rápida y precisa de *Mtb* para poner fin a la enfermedad (Huang et al. 2022), a continuación se describirán brevemente algunas de las técnicas más utilizadas para el diagnóstico de *Mtb*.

2.2.1 Microscopía

La microscopía de frotis de esputo es un método de detección básico para la identificación de *Mtb*. La tinción de Zhiel-Nielsen identifica bacilos ácido alcohol resistentes en la muestra (Anwar et al. 2023). Este método es rápido y de fácil desarrollo en la mayoría de los laboratrios. La desventaja de esta técnica es que tiene una sensibilidad variable del 20 al 80% dependiendo de si la muestra proviene de una infección paucibacilar, tuberculosis

infantil, tuberculosis extrapulmonar o una coinfección con VIH. Otra de las limitantes para el diagnóstico preciso de la Mtb por este método es la alta prevalencia de micobacterias no tuberculosas, en zonas de baja incidencia la especificidad puede alcanzar un 98% (Huang et al. 2022).

La microscopía de fluorescencia, donde se utilizan auramina O o auramina-rodamina, tienen mayor sensibilidad pero un incremento de resultados falsos positivos debido a que se utiliza un colorante fluorocrómico no específico (Huang et al. 2022; de Mora-Souza et al. 2024).

2.2.2 Cultivo sólido y líquido

El estándar de oro recomendado para el diagnóstico de Mtb es el cultivo, ya que el aislamiento permite la identificación de Mtb así como la detección de resistencias a antibióticos. (OMS, 2024). Los medios sólidos utilizados son el Löwenstein-Jensen, Middlebrock 7H10 y 7H11. El cultivo en medio líquido como el medio Middlebrock 7H9 es más rápido y sensible pero más propenso a la contaminación por otras bacterias u hongos en contraste con el medio líquido (Huang et al. 2022).

2.2.3 Identificación

Para identificar Mtb de micobacterias no tuberculosas se realiza un ensayo inmunocromatográfico (ICT) que detecta la proteína Mtb 64 (MPT-64), antígeno específico de Mtb secretado durante el crecimiento bacteriano, a través del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de doble sándwich (ELISA), con una sensibilidad del 98% y especificidad $\geq 99\%$, además de ser una técnica sencilla, rápida sin requerimiento de equipo especial adicional (Huang et al. 2022; OMS, 2024).

2.2.3.1 Pruebas moleculares

2.2.3.1.1 Xpert MTB/RIF

Xpert MTB/RIF es una de las pruebas moleculares más utilizadas en todo el mundo, se basa en el ensayo reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la secuencia *rpoB* específica de *Mtb* utilizando sondas de ácidos nucleicos, tiene una sensibilidad del 90 al 99% e identifica al patógeno así como las resistencias a rifampicina con una sensibilidad del 97% y debido a que esta prueba determina la presencia de bacilos vivos como muertos, no puede ser utilizada para evaluar la evolución del tratamiento. Su uso esta recomendado en países con TB endémica. (Huang et al. 2022; Kay et al. 2022).

2.2.3.2 Diagnóstico inmunológico

2.2.3.2.1 Detección de antígenos

La presencia de antígenos secretados por *Mtb* en una infección extrapulmonar se puede detectar a través de ELISA en muestras como orina, esputo y suero, uno de estos antígenos es el lipoarabinomanano, presente en la envoltura celular de *Mtb* (Seid et al. 2022), un ejemplo es FujiLAM que detecta el lipoarabinomanano en muestras de orina con una sensibilidad del 70%. (Huang et al. 2022)

2.2.3.2.2 Prueba Cutánea de la Tuberculina (TST)

La TST se basa en la detección de hipersensibilidad tipo IV, para estimular linfocitos T previamente sensibilizados y capaces de reconocer antígenos de *Mtb*. Para esta prueba se utiliza el derivado proteico purificado (PPD) de tuberculina, cuando los linfocitos T sensibilizados reconocen el PPD secretan linfocinas solubles proinflamatorias que permiten la permeabilidad vascular produciendo una zona de induración. A las 72 h se mide el diámetro, si es ≤ 5 mm se considera negativo, mientras que ≥ 5 mm se considera positivo, lo que determina si el paciente estuvo en contacto con *Mtb*. (Carranza et al. 2020; Huang et al. 2022).

2.2.3.3 Ensayos de liberación de interferón gamma (IFN- γ)

Este ensayo se basa en la secreción del IFN- γ por linfocitos expuestos a antígenos de Mtb y el resultado no se ve afectado por exposición a micobacterias no tuberculosas ni por la previa vacunación con el Bacilo Calmette-Guérin (BCG), por lo cual resulta ser una prueba más específica en el diagnóstico de Mtb, en contraste con la TST. El IFN- γ secretado se determina a partir de una muestra sanguínea del paciente por medio de la técnica ELISA. (Goletti et al. 2022).

2.3 Respuesta Inmune en la tuberculosis pulmonar

Aproximadamente el 25% de la población mundial presenta evidencia inmunológica de exposición a Mtb (OMS, 2023), la mayoría de las personas que se infectan con el bacilo controlan la infección sin intervención médica desarrollando tuberculosis latente y un pequeño porcentaje de estas personas desarrollan tuberculosis activa en los próximos años o décadas, el cuadro clínico es un espectro amplio en el que se describen infecciones leves hasta fatales (Carabalí-Isajar et al. 2023).

Como se ha mencionado antes, Mtb afecta con mayor frecuencia los pulmones, ya que su anatomía y ultraestructura están en una constante exposición al medio ambiente debido al intercambio gaseoso, por lo que el tejido pulmonar debe ser tolerante a partículas y alérgenos, así como presentar alta protección contra daños producidos por patógenos y replicación microbiana (Corleys & Dorhoi, 2020).

Cuando Mtb entra en el hospedero por bioaerosoles se encuentra con la mucosa respiratoria, compuesta por moco, péptidos antimicrobianos, inmunoglobulinas, citocinas y quimiocinas con la finalidad de impedir el establecimiento de patógenos (Pérez et al. 2014; Corleys & Dorhoi, 2020) (fig. 5). Algunos bacilos son neutralizados por esta primera barrera y unos cuantos logran llegar a la lámina propia que contiene macrófagos M ϕ y linfocitos T asociados a mucosa (Wang et al. 2023) que secretan IFN- γ , TNF y

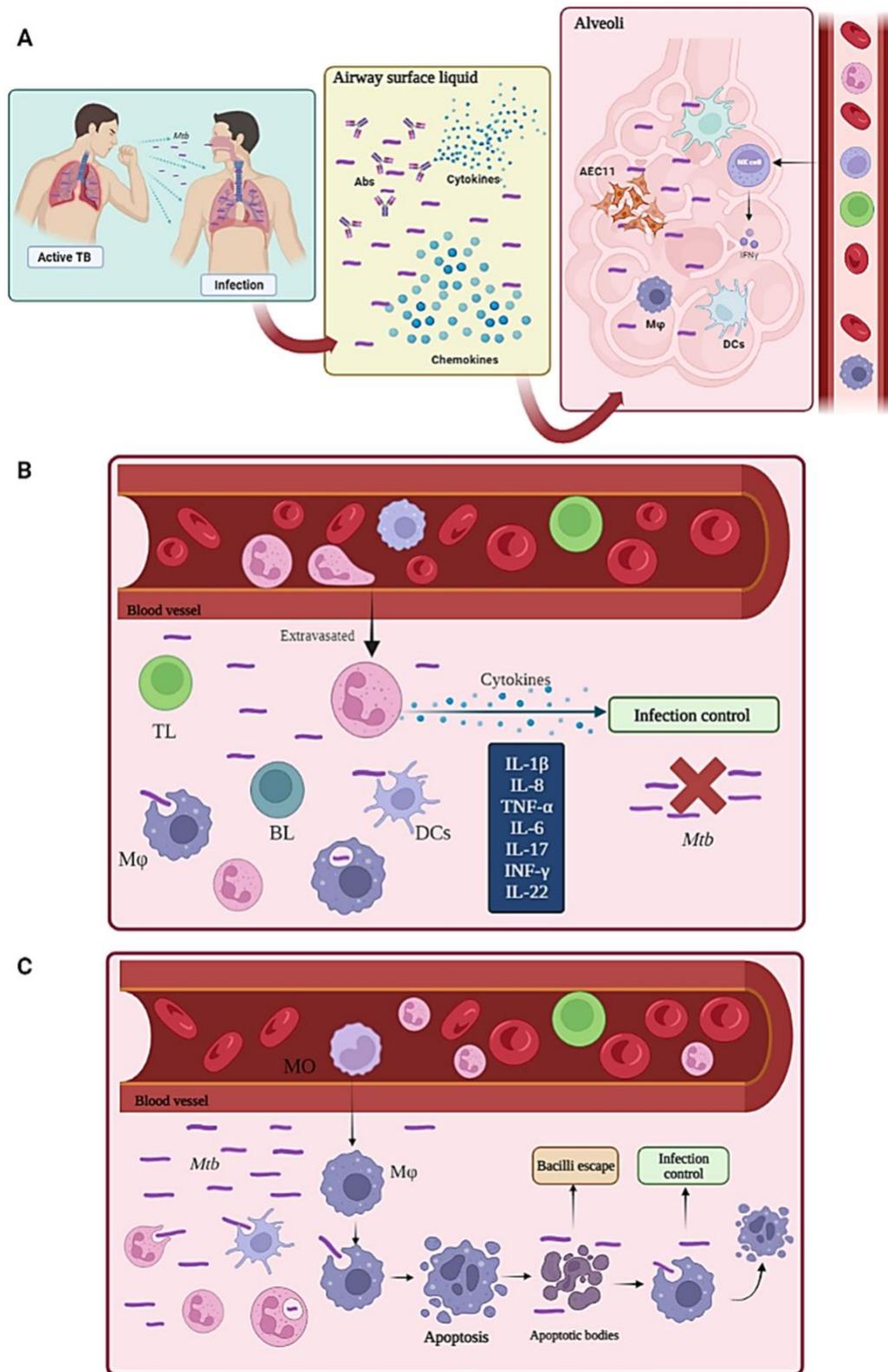


Fig 5. Respuesta inmune innata contra *Mtb*. A) Ingreso del bacilo y establecimiento en alveolo; B) Extravasación de células inmunes y secreción de citocinas y quimiocinas; C) Diferenciación de macrófagos, escape del bacilo por cuerpos apoptóticos. (Carabalí-Isajar et al, 2023).

granzimas que atacan a *Mtb* (Harriff et al, 2014). Cuando *Mtb* escapa de estas barreras y

alcanza los alvéolos compuestos en gran parte por neumocitos tipo II (productores de sustancias surfactantes y antimicrobianas), así como macrófagos residentes de tejido que producen quimiocinas que reclutan a células inmunitarias como Natural Killer (NK) las cuales inhiben el crecimiento de Mtb por medio de la desgranulación inducida por IL-2 o contribuyendo a la eliminación de las células infectadas por Mtb (Corleys & Dorhoi, 2020) (fig. 5).

Otras células que se extravasna son los neutrófilos, células innatas que participan en la producción de citocinas involucradas en control de infecciones y quimiocinas que reclutan monocitos que se diferencian en M ϕ y DC. Además, se ha descrito que la muerte por apoptosis de neutrófilos promueve la inmunidad mediada por células T, B, NK. Las DC migran al ganglio linfático para llevar a cabo la presentación de antígeno de la micobacteria a más linfocitos.

Cuando los M ϕ fagocitan al bacilo, algunas micobacterias mueren en el fagolisosoma, sin embargo, las bacterias pueden escapar en cuerpos apoptóticos cuando M ϕ induce apoptosis, infectando a nuevos M ϕ que migran a sitios de lesión facilitando un nuevo nicho para la proliferación de los microorganismos (Corleys & Dorhoi, 2020).

Hemos descrito algunas de las funciones de las células innatas en la infección con Mtb, a continuación cruzaremos el puente hacia la respuesta inmune adaptativa comenzando por la presentación de antígeno. Esta respuesta está mediada por las interacciones del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) presente en las células fagocíticas que destruyen al patógeno, nos referimos a las moléculas provenientes del patógeno expresadas en el MHC II - Receptor de células T (TCR), la interacción de estas tres moléculas en conjunto con moléculas coestimuladoras y la presencia de citocinas permite el desarrollo de linfocitos T CD4⁺ que producen activamente TNF, IL-12, además de INF- γ , el cual está descrito como una molécula importante en la respuesta protectora contra Mtb, estos linfocitos son conocidos como Th1. Por otra parte, los linfocitos Th2 productores de IL-4, IL-5 e IL-6 que favorecen la inactivación de macrófagos M ϕ e inhiben la autofagia, función contraria a las moléculas secretadas por Th1. Otra población

descrita en la inmunidad innata son las células Th17, secretoras de IL-17 que ayuda en el reclutamiento de poblaciones Th-1 e inducción de IL-22, esta última citocina estimula la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y la producción de las moléculas de interés en este proyecto: péptidos antimicrobianos (Carabalí-Isajar et al. 2023).

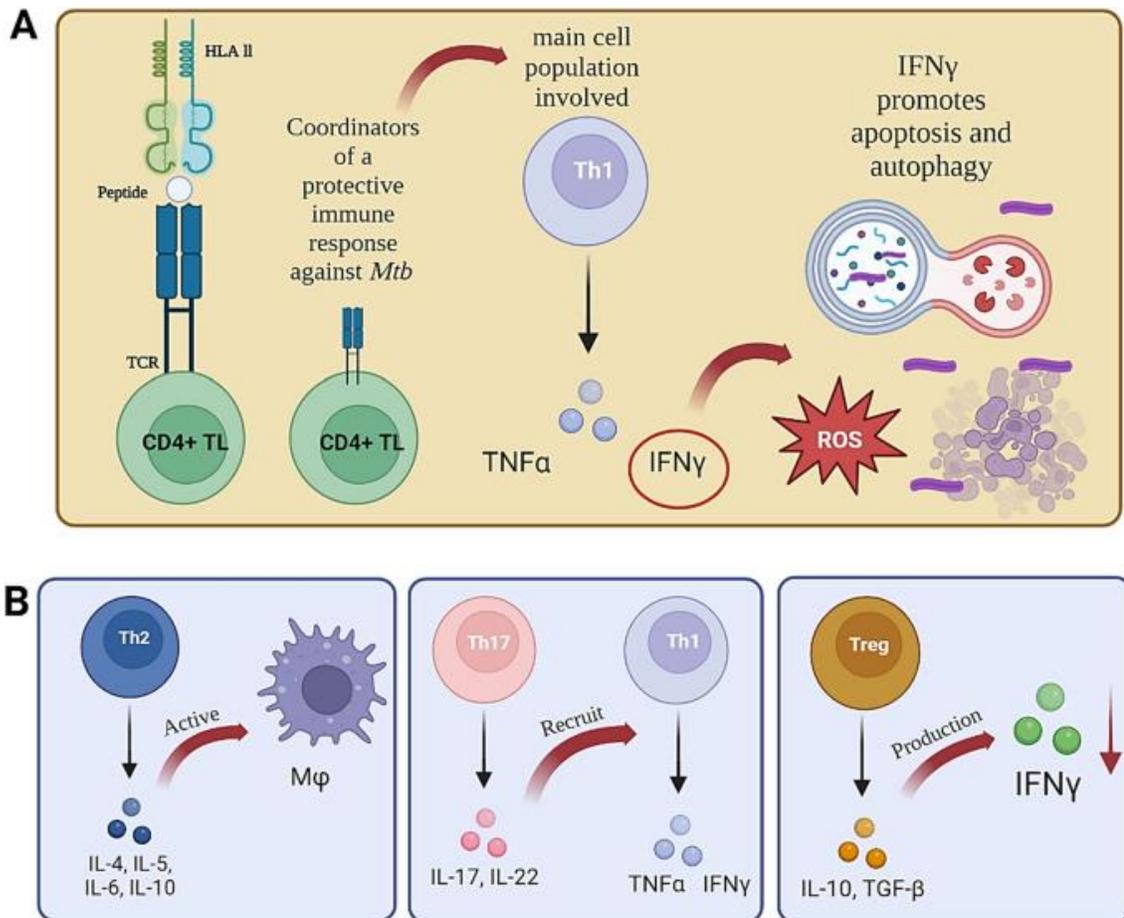


Fig. 6. Respuesta inmune adaptativa contra *Mtb*. A) Presentación de antígeno y sus efectos; B) Poblaciones de linfocitos T activados y sus diferentes funciones; C) Diferenciación de macrófagos, escape del bacilo por cuerpos apoptóticos. (modificado de Carabalí-Isajar et al, 2023).

Las células T reguladoras (Treg), como su nombre lo indica, regulan la producción de IFN- γ , molécula que ayuda a las células fagocíticas a contener al bacilo promoviendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) así como la promoción de la apoptosis y autofagia (Chin et al. 2017).

2.4 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos son elementos de la inmunidad innata que protegen a los organismos frente a infecciones de diferentes tipos. Se han descrito como moléculas de amplio espectro ya que se ha reportado que tienen actividad contra bacterias gram positivas y negativas, hongos, virus y protozoarios (Ajesh & Sreejith, 2022). Son moléculas con gran diversidad estructural,

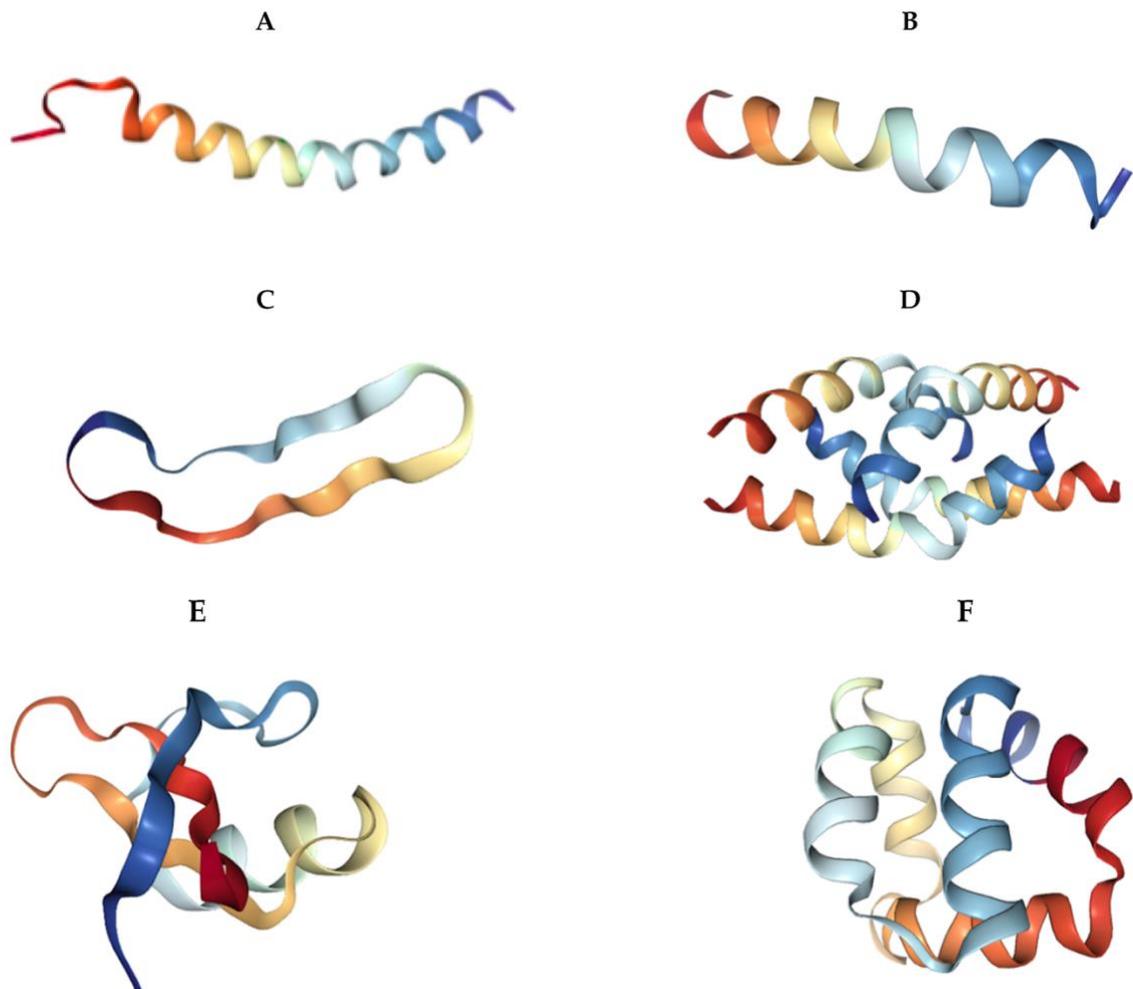


Fig. 7. Péptidos antimicrobianos en la naturaleza. A) Catelicidina de humano (*Homo sapiens*) LL-37; B) péptido policatiónico antimicrobiano Magainina-2 de la rana de uñas africana (*Xenopus laevis*); C) péptido antimicrobiano cíclico RTD-1 de *Macaco Rhesus*; D) polipéptido melitina presente en el veneno de la abeja europea (*Apis mellifera*); E) defensina del tomate (*Solanum lycopersicum*) TPP3; F) bacteriocina AS-48 de *Enterococcus faecalis*.

algunos pueden presentarse como hélices o láminas simples mientras que otros tienen estructuras más complejas (fig. 7).

Se encuentran de manera común en la piel, mucosas, gránulos de neutrófilos o venenos como en el caso de *Apis mellifera* y su expresión está asociada a la interacción de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) con células del sistema inmune, así como a la presencia de citocinas en respuestas innatas (Ajesh & Sreejith, 2022).

Debido a las alarmantes cifras de bacterias resistentes a antibióticos que se han observado en los últimos años, se ha puesto un mayor interés en estudiar las propiedades de los péptidos antimicrobianos, ya que se ha reportado que además de tener mayor efectividad comparada con los antibióticos comerciales, modulan la respuesta inmune, regulan la inflamación y reducen la aparición de cepas resistentes a los antibióticos (Magana et al. 2020). Algunos péptidos antimicrobianos ya se utilizan como terapéuticos, uno de ellos son el grupo de las catelicidinas, descritas por su alta efectividad antimicrobiana, actividad quimio atrayente e inducción de la actividad fagocítica. (Ajesh & Sreejith, 2022)

2.4.1 Catelicidinas

Las estructuras que nos interesan en esta investigación son las catelicidinas, péptidos α -helicoidales que por sus cargas positivas pueden interaccionar con membranas bacterianas cargadas negativamente para poder permeabilizarlas, dañar la célula y permitir el paso de moléculas más grandes llevando a la bacteria a una muerte celular (Vandamme et al. 2012; Lei et al. 2019). Otras actividades descritas para las catelicidinas son: propiedades inmunomoduladoras (promueven la fagocitosis, autofagia, producción de trampas extracelulares ROS); capacidad de reclutar, diferenciar y polarizar diferentes poblaciones celulares como Linfocitos T, CD y monocitos; inducen citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF y suprimen mediadores proinflamatorios (Vandamme et al. 2012; Alford et al.

2020). Debido a todas estas propiedades, actualmente ya se emplean clínicamente como anti inflamatorios, adyuvantes y anticancerígenos, entre otras aplicaciones (Alford et al. 2020).

2.4.1.1 Estructura y mecanismo de acción

El mecanismo de acción de las catelicidinas se deriva de sus propiedades fisicoquímicas estructurales, siendo péptidos α -helicoidales catiónicos e hidrofóbicos (fig. 8) que actúan sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Vandamme et al. 2012; Dlozi et al. 2022). Los mecanismos de acción propuestos para las catelicidinas y las defensinas para a tacar a las bacterias son daño en membrana celular, fragmentación de ADN y regulación de la inmunidad (Dlozi et al. 2022; Lei et al. 2022), sin embargo, el mecanismo de acción mayormente descrito es la unión selectiva del péptido con estructuras externas de la membrana bacteriana que, debido a sus cargas positivas neutraliza y realiza cambios conformacionales de los cuáles se han descrito cuatro modelos hipotéticos descritos para la perforación de la membrana (fig. 9) (Dlozi et al. 2022; Ajesh & Sreejith, 2022).

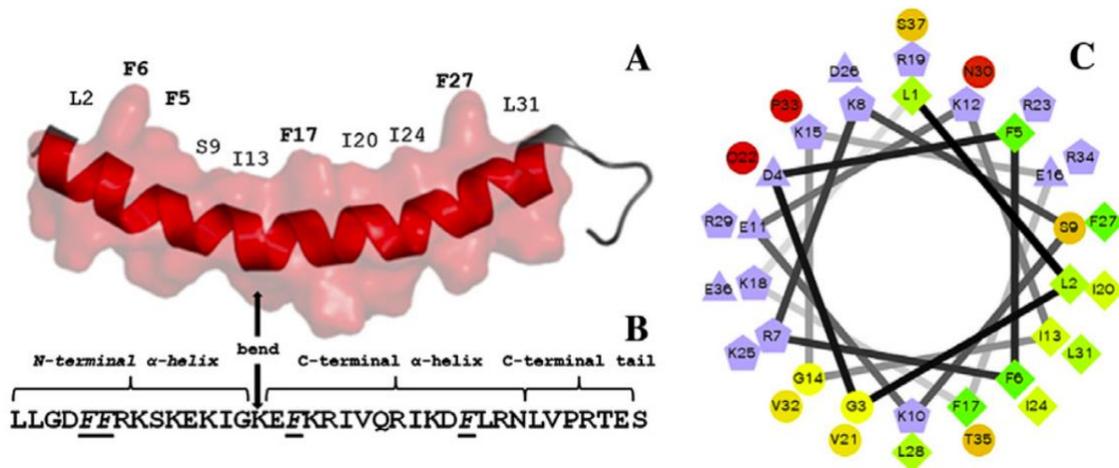


Fig. 8. Estructura de catelicidina LL-37. A) Tridimensionalmente se observa como α -hélice; B) compuesta por regiones N-terminal-curvatura-C terminal-cola C-terminal; C) representación en rueda helicoidal en donde los residuos hidrofílicos se representan como círculos mientras que los residuos hidrofóbicos como diamantes, los negativaente cargados como triángulos y aquellos con cargas positivas como pentágonos. (Vandamme et al. 2012)

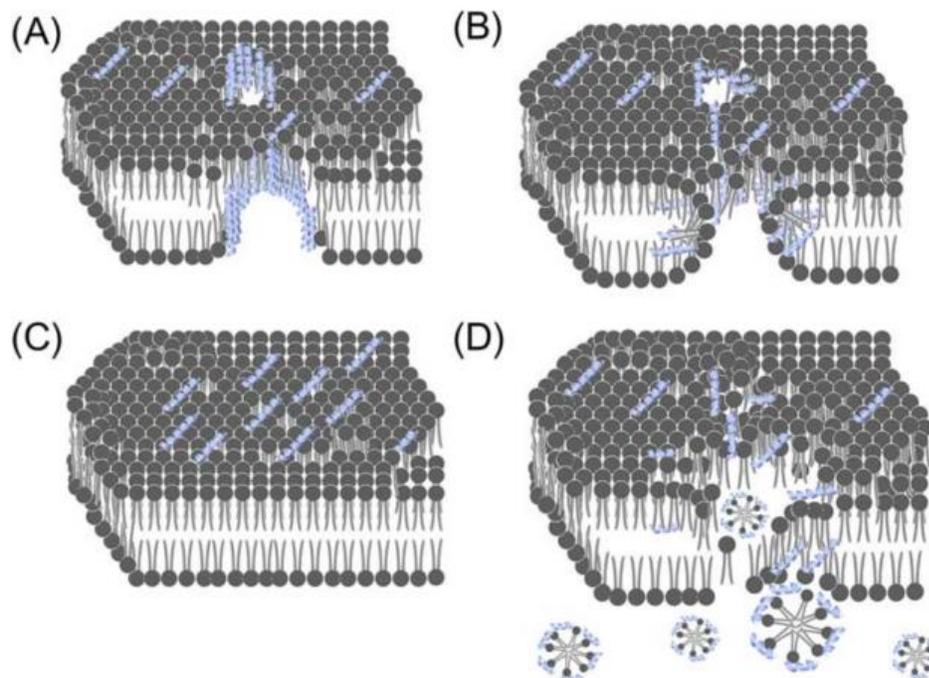


Fig. 9. Mecanismos hipotéticos de acción de las catelicidinas. A) Modelo barril-varilla; B) Modelo de poro toroidal; C) Modelo de alfombra; D) Modelo detergente. (Ajesh & Sreejith, 2022)

Otro modelo hipotético explica que causa la muerte celular interrumpiendo procesos fisiológicos como la replicación, transcripción o síntesis de proteínas (Dlozi et al. 2022).

2.4.1.2 Catelicidina proveniente de Búfalo de Agua

Palacios y colaboradores (2022) evaluaron la actividad de la catelicidina proveniente de búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) llamada WBCATH, sobre *M. tuberculosis*. Los péptidos no fueron citotóxicos en concentraciones de 10 a 160 $\mu\text{g/mL}$ y que el efecto microbicida es dosis-dependiente desde las concentraciones de 16 $\mu\text{g/mL}$ hasta 64 $\mu\text{g/mL}$ sobre la cepa MDR CIBIN99 y la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. WBCATH produjo disrupción de membrana, formación de vacuolas citoplasmáticas, fragmentación de la pared celular y formación de cuerpos esféricos electrodensos (fig. 10). Cuando evaluaron el efecto de los péptidos antimicrobianos sobre la carga bacteriana en macrófagos alveolares y producción

de citocinas *in vitro* en donde reportaron una reducción de la carga bacteriana del 86.27% al exponer a los macrófagos infectados por 24 h a la concentración de 160 $\mu\text{g/mL}$ y reportaron un incremento significativo de producción de citocinas proinflamatorias. Por otra parte, demostraron que WBCATH tiene actividad terapéutica sobre el modelo murino de tuberculosis pulmonar a 32 $\mu\text{g/mL}$ administrado por vía intratraqueal reduciendo la carga bacteriana a los 28 y 60 d posteriores al inicio del tratamiento, encontrando que los ratones infectados con la cepa H37Rv mostraron disminución significativa de zonas neumónicas, mientras que los infectados con la cepa CIBIN99 mostraron más zonas neumónicas que los grupos control. En ambas condiciones los péptidos indujeron la expresión de citocinas protectoras.

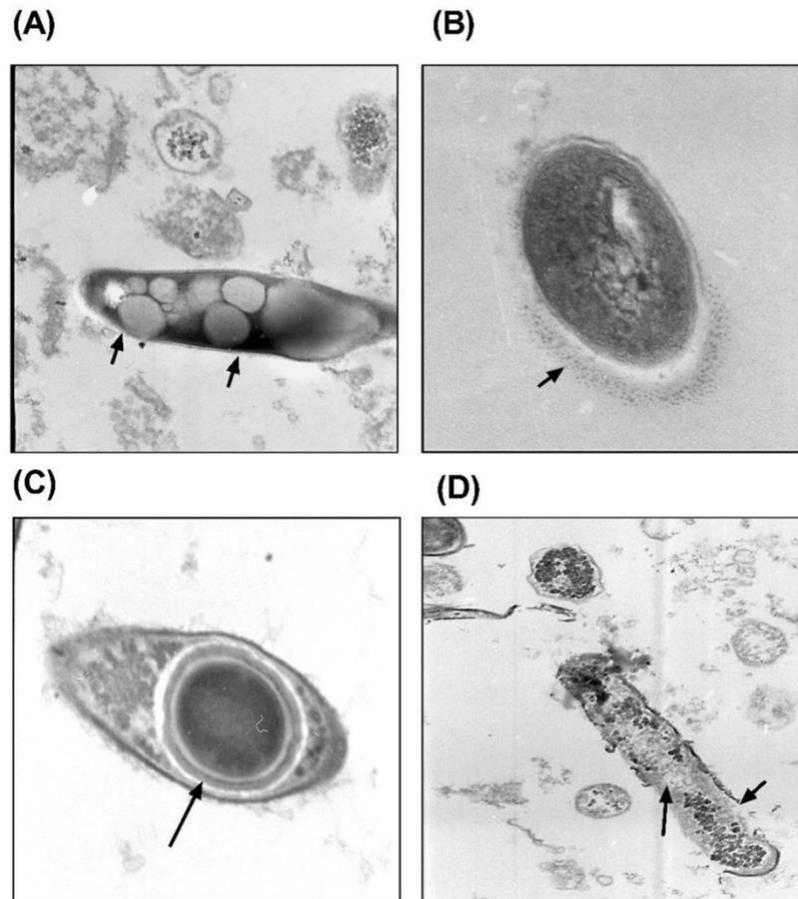


Fig. 10. Micrografías representativas de Mtb H37Rv expuestas a 32 y 64 $\mu\text{g/mL}$ de WBCATH en donde se observa la formación de A) vacuolas citoplasmáticas; B) y D) fragmentación de la pared celular bacteriana y C) la formación de un cuerpo esférico electrodensos.

2.4.1.3 Catelicidina proveniente de Canino

En un estudio realizado por Sosa y colaboradores (2012) observaron la efectividad la catelicidina proveniente de canino (*Canis lupus familiaris*) K9CATH, contra *M. tuberculosis*, reportando que no es citotóxico a partir de concentraciones de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y con una CMI de 10.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$; de forma similar a WBCATH, K9CATH fragmenta la membrana de Mtb y promueve cambios citoplasmáticos (fig. 11).

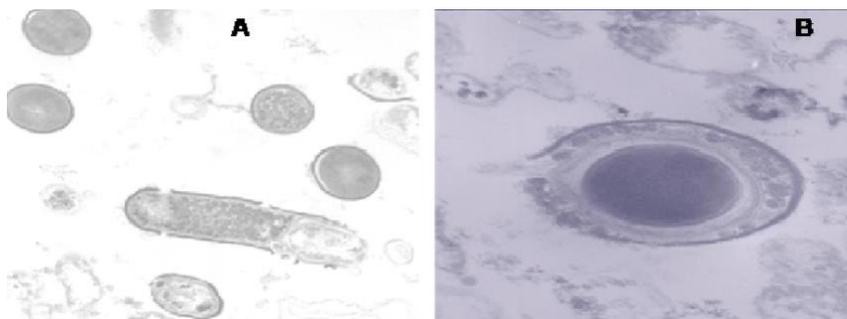


Fig. 11. Micrografías representativas de Mtb H37Rv expuestas a K9CATH en donde se observa la formación de A) fragmentación de la pared celular bacteriana y B) la formación de un cuerpo esférico.

En el modelo in vivo a una concentración de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ redujo significativa de carga bacilar y las áreas neumónicas a los 30 y 60 d de tratamiento.

2.5 Nanotecnología aplicada a medicina

La nanotecnología es una rama de la ciencia e ingeniería que busca manipular la materia a escala nanométrica para crear nuevas estructuras o materiales entre 1 y 100 nm; estas dimensiones confieren a los materiales características físicas, químicas y biológicas que a una escala macrométrica no poseen y que hasta la fecha se continúan estudiando (OMS, 2017). Una de las nuevas ramas de esta tecnología es la nanomedicina, en la que se estudian las diversas aplicaciones que tienen los materiales en el campo médico. Se ha descubierto que utilizar nanomateriales como acarreadores de tratamientos disminuye la concentración que se requiere para que cumplan su función y por ende la toxicidad que

producen. Ejemplo de ello son los quimioterapéuticos para el cáncer, mejorando su estabilidad y biodisponibilidad en la mucosa así como su desplazamiento de forma rápida por el torrente sanguíneo (Bhumkar et al. 2007; Haleem et al 2023). Se clasifican en 3 grupos dependiendo de su composición química (fig. 12).

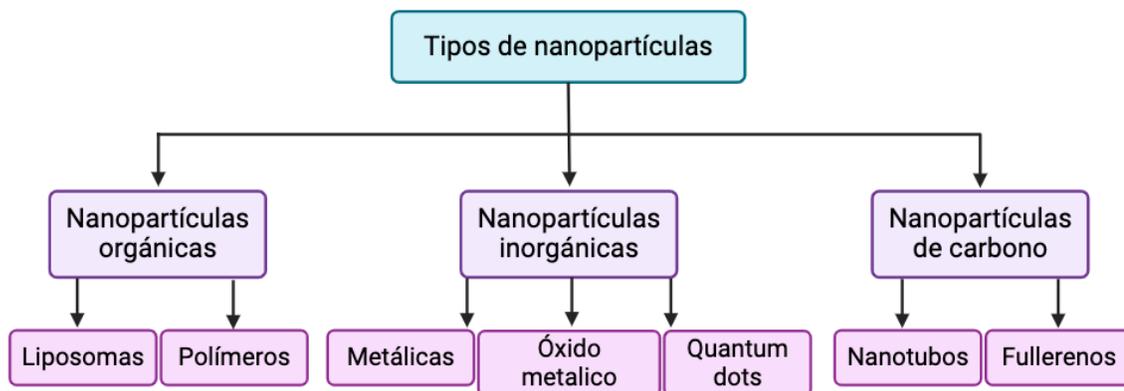


Fig. 12. Clasificación de nanopartículas en el campo médico (Modificado de Haleem et al. 2023).

2.5.1 Nanopartículas de oro

En este proyecto nos centraremos en las partículas metálicas, específicamente las de oro, las cuales han resultado útiles especialmente en el diagnóstico y administración de fármacos (Haleem et al. 2023). Las nanopartículas de oro se describen como excelentes sistemas de bioconjugación con moléculas biológicas, y se transportan mediante difusión pasiva, transporte activo, en función de la energía. Pueden administrarse por vía oral para luego migrar y absorberse en la mucosa intestinal o por vía intravenosa para llegar a los órganos diana (Giljohann et al, 2020; Hammami & Alabdallah, 2021).

2.5.1.1 Actividad antibacteriana

Zhou y colaboradores (2012) evaluaron la actividad antibacteriana de nanopartículas de oro contra *M. bovis* y *Escherichia coli*. Encontraron actividad antimicrobiana en concentraciones de 0.1 a 10 µg/mL, demostrando que las nanopartículas de oro reducen la carga bacteriana de bacterias Gram negativas y Gram positivas.

2.5.1.2 Nanopartículas de oro reducidas con quitosano.

El quitosano es un polímero proveniente de crustáceos que se ha utilizado ampliamente en la administración y bioconjugación con fármacos ya que actúa como un potenciador de absorción de proteínas por parte de las mucosas. Devika y colaboradores (2007) crearon nanopartículas de oro utilizando quitosano como agente reductor para posteriormente cargarlas con insulina (fig. 13) una molécula susceptible a degradación enzimática, además de representar baja biodisponibilidad cuando se administra sola. Una vez que obtuvieron los complejos los administraron en ratas diabéticas. Encontraron que las partículas producidas mejoraron significativamente la absorción y penetración de la insulina por vía transmucosa, reduciendo los niveles de glucosa en sangre en contraste con sus grupos control. Concluyendo que las nanopartículas de oro reducidas con quitosano pueden ser sistemas de administración prometedores cuando se requiere administrar moléculas biológicas que requieran protección contra degradación enzimática.

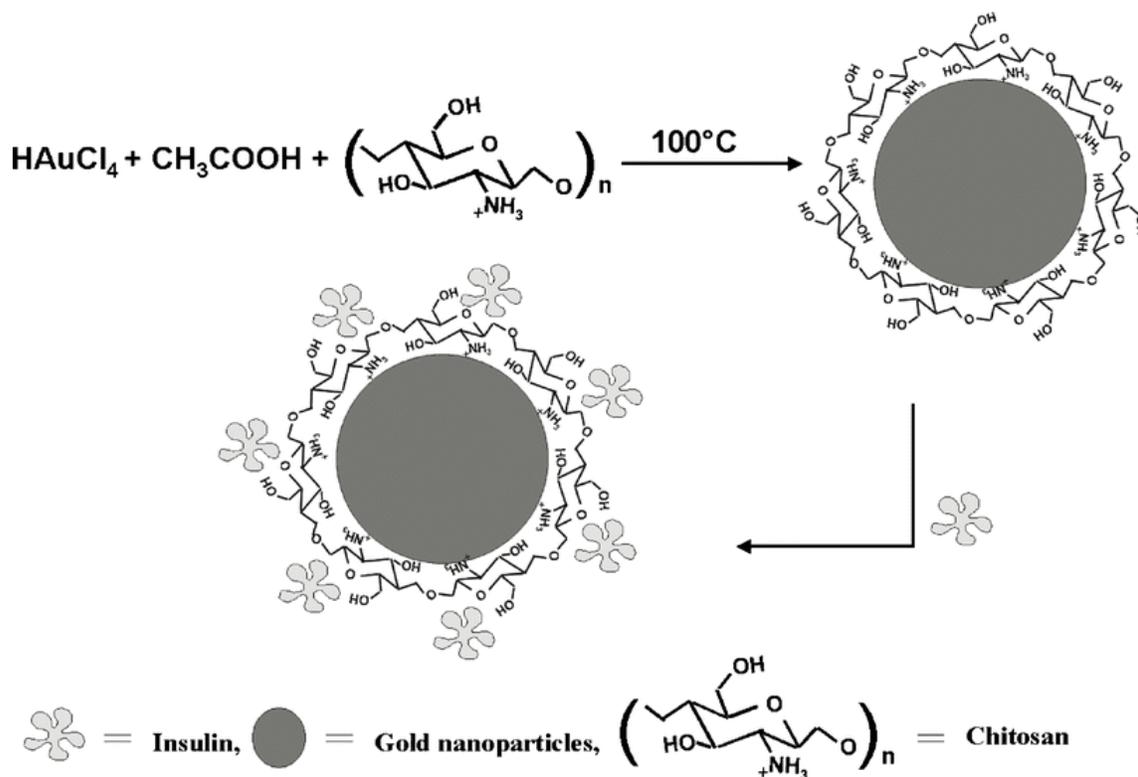


Fig. 13. Diagrama teórico esquemático de la producción de nanopartículas de oro reducidas con quitosano y cargadas con insulina (Devika et al. 2007).

2.5.1.1.1 Actividad antibacteriana

La actividad antimicrobiana de nanopartículas de oro reducidas con quitosano fue evaluada por Fuster y colaboradores (2020), quienes realizaron un panel de 13 diferentes nanopartículas de oro con quitosano en donde modificaron la concentración de quitosano y tipo de quitosano en base a su peso molecular. Reportaron que las nanopartículas mostraron actividad antimicrobiana significativa en relación con la concentración de quitosano entre 16 y <65 $\mu\text{g/mL}$ contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

3. JUSTIFICACIÓN

Se estima que la tuberculosis causa 10 millones de casos nuevos y 1.5 millones de muertes cada año. El aumento de cepas MDR pronostica que para el año 2030 comenzarán a surgir pandemias por bacterias MDR, entre ellas *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis. La aparición de cepas MDR se ha atribuido al mal uso o al abandono del tratamiento con antibióticos, por lo que se requiere de nuevas estrategias para combatir las infecciones ocasionadas por estas cepas, incluyendo la reducción en el tiempo de tratamiento y evitando la generación de más cepas MDR. En este trabajo proponemos acoplar péptidos antimicrobianos a nanopartículas de oro para potenciar su actividad antimicrobiana así como alargar su vida media.

4. HIPÓTESIS

Las nanopartículas de oro con péptidos antimicrobianos provenientes de mamíferos reducen la carga bacteriana de *M. tuberculosis* en macrófagos alveolares en comparación con el péptido solo y las nanopartículas sin péptido.

5. OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto antimicrobiano de nanopartículas de oro reducidas a partir de un complejo de quitosano y catelicidinas provenientes de mamíferos sobre la línea celular MH-S (macrófagos alveolares) infectados con las cepas H37Rv (referencia) y CIBIN99 (MDR) de *Mtb*.

Específicos

1. Estandarizar un método de síntesis química para la obtención de nanopartículas de oro reducidas con quitosano y catelicidinas provenientes de búfalo de agua (WBCATH) y canino (K9CATH) y caracterizar dichas nanopartículas.
2. Determinar la citotoxicidad *in vitro* por parte de las nanopartículas de oro sobre las líneas celulares de macrófagos alveolares (MH-S) y neumocitos tipo II (A549).
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) *in vitro* de las nanopartículas de oro sobre las cepas H37Rv Stanford y CIBIN99 MDR de *M. tuberculosis*.
4. Determinar la captación de las nanopartículas de oro por parte de macrófagos alveolares.
5. Evaluar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas sobre la línea celular MH-S infectada con las cepas H37Rv Stanford y CIBIN99 MDR de *M. tuberculosis*.
6. Cuantificar la expresión de citocinas expresadas por la línea celular MH-S infectada con las cepas H37Rv Stanford y CIBIN99 MDR de *M. tuberculosis* y tratadas con las nanopartículas.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

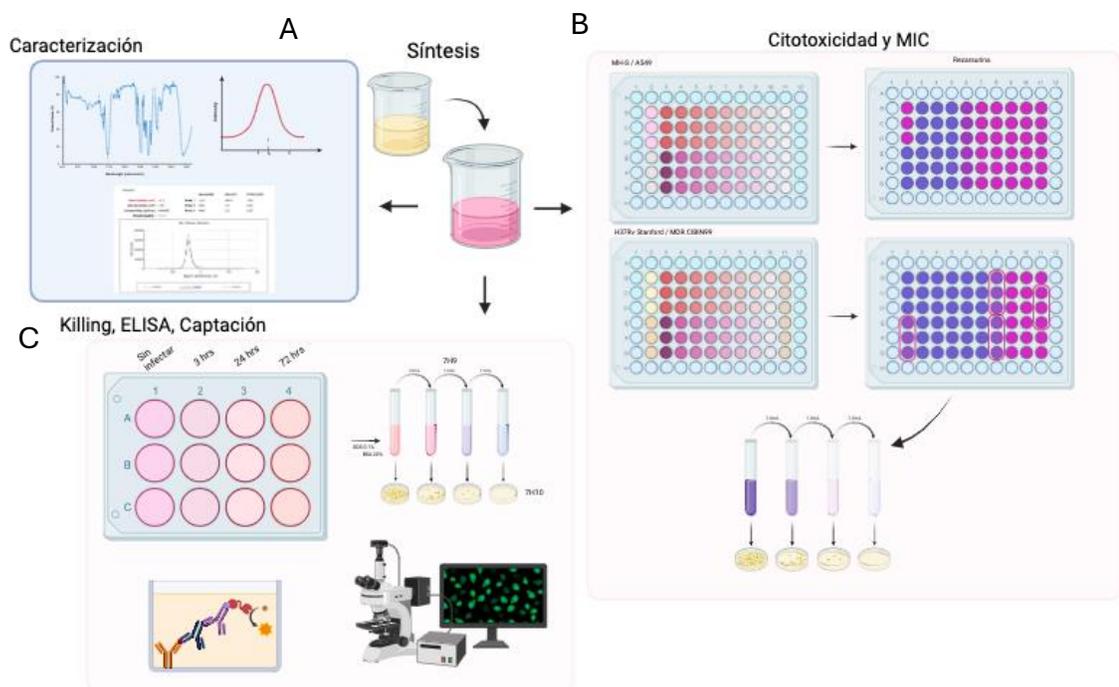


Fig. 14. Estrategia experimental del proyecto, la cual consta de tres fases. A) Síntesis y caracterización de las nanopartículas; B) Evaluación de la citotoxicidad en células MH-S y A549, determinación de la concentración mínima inhibitoria en las cepas H37Rv y MDR; C) Observación de la captación de partículas por parte de macrófagos alveolares y evaluación del efecto antimicrobiano e inmunomodulador de las nanopartículas sobre macrófagos alveolares infectados con Mtb.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas de oro.

7.1.1 Obtención de las nanopartículas

Los péptidos utilizados WBCATH y K9KATH para la síntesis de las nanopartículas fue donado por el Dr. Tonatiuh Melgarejo de Western University of Health Sciences, CA, USA.

Las nanopartículas se obtuvieron a través de una síntesis química con base en el método Turkevich (Dong et al, 2020), adicionando 1.5 mL de una solución de ácido cloroáurico (HAuCl₄) al 1 mM en un vaso de precipitado de 10 mL y calentándolo a $95^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, una vez que se llegó a la temperatura se agregó por goteo 0.5 mL del péptido previamente agitado con quitosano de bajo peso molecular al 1% durante una noche a temperatura ambiente para llegar a una concentración final de 640 $\mu\text{g/mL}$ de péptido, se dejó reaccionar la solución en agitación constante hasta que se observó cambio de color. Una vez obtenidas las nanopartículas se atemperaron y almacenaron a 4°C para su posterior caracterización y uso experimental.

7.1.1 Caracterización de las nanopartículas obtenidas

7.1.1.1 UV-Vis Plasmón de Resonancia Superficial (PRS)

Para observar el PRS se utilizó el equipo NanoDrop™ 2000/2000c ThermoFisher Scientific, USA. Se colocaron 3 μL de las nanopartículas concentradas en pedestal del espectrofotómetro, el espectrofotómetro realizó un barrido de 200 a 800 nm arrojando una gráfica con unidades de longitud de onda en nanómetros en el eje de las X y absorbancia en el eje Y, con la finalidad de confirmar la presencia de puntos de nucleación metálicos en la solución. Esta metodología se repitió durante los días 1, 3, 7, 15 y 21 para monitorear la estabilidad de las partículas.

7.1.1.2 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Para la recopilación y análisis de datos de tamaño y potencial Z de las partículas, se utilizó el software ZS Xplorer de Malvern Panalytical.

7.1.1.2.1 Tamaño de nanopartículas

Para obtener el tamaño y la polidispersidad promedio de las nanopartículas se tomaron 10 μL de la síntesis y se diluyeron en 990 μL de agua mili Q. Esta dilución se agregó a una celda de plástico y se colocó en el Zetasizer ULTRA Malvern Panalytical UK., para determinar el tamaño a partir de la dispersión de luz dinámica y el movimiento browniano de las partículas en suspensión realizando 3 análisis de 15 repeticiones cada uno. Esta metodología se repitió durante los días 1, 3, 7, 15 y 21 para monitorear cambios en el tamaño de la partícula. Los parámetros utilizados se encuentran en Anexos I.

7.1.1.2.2 Potencial Z de nanopartículas

Para determinar la carga neta superficial de las nanopartículas se agregó un volumen de 800 μL de la solución concentrada a una celda especial (DTS1070) que conduce una carga eléctrica definida, posteriormente la celda se colocó en el Zetasizer ULTRA Malvern Panalytical UK., y se realizaron 3 análisis de 15 repeticiones cada uno. Esta metodología se repitió durante los días 1, 3, 7, 15 y 21 para monitorear cambios en el tamaño de la partícula. Los parámetros utilizados se encuentran en Anexos I.

7.2 Ensayos In Vitro

Todos los experimentos descritos a continuación están basados en el Manual de Procedimientos Técnicos del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, actualizado a octubre del 2022 y fueron realizados en el Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3 (BSL3) de acuerdo con manuales de bioseguridad del Departamento de Patología, sección de Patología Experimental.

7.2.1 Ensayos en las líneas celulares MH-S y A549

7.2.1.1 Descongelamiento y mantenimiento de las líneas celulares

Las células previamente criopreservadas en nitrógeno líquido se descongelaron a 37°C e inmediatamente se agregaron a 10 mL de RPMI + SFB 10% atemperado a 37°C para prevenir los efectos tóxicos del DMSO, una vez homogenizado se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min, transcurrido el tiempo, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en medio fresco atemperado a 37°C, la suspensión se colocó en cajas de cultivo que fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ para su posterior mantenimiento y uso experimental.

Para mantener las líneas celulares se realizó cambio de medio cuando el pH del medio se acidificara. El medio se descartó, se realizaron dos lavados con PBS y se agregó medio completo nuevo.

7.2.1.2 Conteo celular

Una vez que el cultivo celular se estableció se procedió a realizar los ensayos con células, en los cuales se requirió de cantidades específicas dependiendo el tipo de ensayo. Para el conteo se tomó una placa de cultivo, se realizaron dos lavados con PBS 1x, se colocó 1 mL de medio RPMI + SFB 10% + 1x de antibiótico estreptomycinina al 10x (medio completo) y con ayuda de un raspador de hoja fija se desprendieron las células de la

superficie de la placa, se recuperó el mL con células en un tubo de 15 mL para centrifuga y se llevó a un volumen de 5 mL, la suspensión se centrifugó a 1500 rpm por 10 min, al finalizar se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 10 mL de medio completo, se homogenizó y se tomaron 100 μ L para colocarlos en un eppendorf con 100 μ L de azul tripano al 0.4%, se homogenizó y se colocaron 10 μ L en portaobjetos contador de células para el contador de células automatizado TC 10 BIORAD 145-0001, EU., una vez obtenido el valor se realizaron los cálculos pertinentes para sembrar la cantidad requerida en cada experimento.

7.2.1.3 Citotoxicidad en línea celular MH-S y A549

Se sembraron 10,000 cel/pozo en placas de 96 pozos en un volumen final de 100 μ L de medio completo por pozo un día previo al ensayo, se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ colocando agua estéril en los pocillos de los bordes para evitar evaporación. Al día siguiente se prepararon las soluciones de las partículas a probar en diluciones seriadas 1:1 partiendo de 0.5 mM en el caso de las AuNps y de 320 μ g/mL – 0.5 mM en las nanopartículas de oro con péptido. Se retiró el medio de los pocillos para colocar las diferentes diluciones de nanopartículas a probar y se incubaron por 48 h. Los grupos experimentales fueron AuNps (nanopartículas de oro control), AuWBNps (nanopartículas de oro con catelicidina de búfalo de agua), AuK9Nps (nanopartículas de oro con catelicidina de canino), además de medio completo y DMSO al 10% en medio completo como control positivo y negativo de viabilidad respectivamente. Una vez transcurrido el tiempo se retiró el medio de los pocillos, se lavaron con PBS 1x y se agregaron 100 μ L de medio completo a cada pocillo y 20 μ L de resazurina 0.15 mg/mL (disuelta en PBS 1x pH 7.4), posteriormente la placa se incubó a 37°C con 5% de CO₂ por 24 h, una vez transcurrido el tiempo se determinó la absorbancia a 600 nm en el lector de placas EPOCH 2 de BioTek®. Los resultados se comparan con los controles positivo (medio completo, 100% células vivas) y negativo (DMSO 10%, 0% células vivas) realizando reglas de tres para evaluar qué tan tóxicas fueron las partículas, los datos se graficaron colocando en el eje de las X los tratamientos y en el eje de las Y el porcentaje de viabilidad obtenido.

7.2.2 Ensayos sobre cepas bacterianas de Mtb H37Rv y CIBIN99

7.2.2.1 Descongelamiento de cepas de Mtb

Para iniciar un cultivo de Mtb se coloca un vial con 1 mL de bacteria previamente congelada a -80°C a 35°C . Una vez descongelada se sonica por 30 s y se coloca en medio 7H9 con OADC para incubarse a 35°C con 5% de CO_2 por 14 d.

7.2.2.2 Conteo de las células bacterianas

De un cultivo iniciado 14 d previos se toma 1 mL y se coloca en una celda de plástico para leer la densidad óptica (DO) a 600 nm. Una vez obtenida la lectura se realizaron los cálculos para llevar la solución a una DO de 0.05 diluyendo en 7H9 con OADC las cepas.

7.2.2.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las partículas sobre las cepas de Mtb

El ensayo para determinar la CMI se realizó en una placa de 96 pozos. Se agregaron 100 μL de medio 7H9 en los pozos de las filas B a G, columnas 4 a 11, 200 μL en las filas B a D columna 2 (control de medio) y se dejó vacía la columna 3 ya que en esta se agregaron 200 μL de las nanopartículas stock diluidas 1:1 con medio 7H9 en las filas B a D para un tipo de partícula y E a G para otro tipo de partícula, con ayuda de una pipeta multicanal se realizaron diluciones seriadas del compuesto 1:1 a partir de la columna 3 hasta la columna 10 en donde se descartaron los últimos 100 μL para dejar en el pocillo 100 μL de la disolución más baja de nanopartícula a probar.

La suspensión bacteriana obtenida con una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0.05 en medio 7H9 con OADC se homogeniza en un vórtex por 15 s y se sónica por 45 s. De esta suspensión se añadieron 100 μL en las filas B a G de la columna 11 a la 3, es decir, de la concentración más baja de la nanopartícula a la más alta. En las filas E a G de la columna 2 se agregaron 198 μL

de medio 7H9 + 2 μ L de bacteria (control 1%) y en la columna 11 se agregan 100 μ L de medio 7H9 + 100 μ L de la bacteria (control 50%) (todo lo descrito se muestra en la figura 15 para mejor comprensión del acomodo). Se aseguró la tapa de la placa con cinta adhesiva.

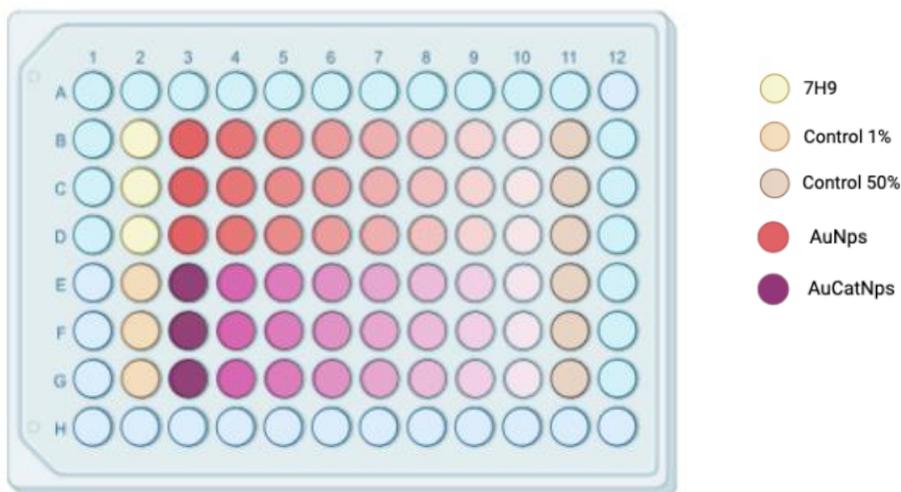


Fig. 15. Esquema de la distribución de las concentraciones de partícula a evaluar y controles.

Para corroborar el número de bacterias inoculadas en cada ensayo (control de calidad), se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC), sembrando 10 μ L de diluciones seriadas 1:10 (preparadas en medio 7H9 con OADC) de la suspensión bacteria en placas de medio 7H11 con OADC.

Las placas de 96 pozos se colocaron en una cámara húmeda y se incubaron a 35°C en agitación constante a 70 rpm durante 7 d, mientras que las placas de control de calidad se incubaron a 37°C y CO₂ 5% por 12 d para realizar un primer conteo de UFC y se dejaron incubando 7 d más para realizar un segundo conteo de UFC por aquellas colonias de crecimiento tardío.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 30 μ L de resazurina al 0.02% a las placas de 96 pozos, se incubaron por 48 h en las condiciones previamente descritas para observar el cambio de color y tomar fotografías. Se realizó una siembra de diluciones

seriadas a partir del pozo en donde se evitó el cambio de color, es decir, un pozo antes de los pozos que viraron a rosado por la reacción metabólica bacteriana. Las diluciones seriadas se realizaron en placas de 96 pozos, se sembraron por duplicado en medio 7H11 y se incubaron a las condiciones y días previamente descritos para el control de calidad.

Para el conteo de UFC se puntearon las colonias, se capturaron los datos en hojas de cálculo del software Prism 8, se realizó el análisis estadístico y las gráficas; con ayuda del control de calidad y las UFC de la CMI se determinó la concentración precisa de partículas que elimina a 100,000 células bacterianas.

7.2.3 Captación de las nanopartículas por parte de macrófagos alveolares.

En Chambers slides™ (cámaras sobre portaobjetos) de cuatro divisiones de Thermo Fisher Scientific EU., se sembraron 30,000 células en 500 µL de medio RPMI completo y se incubaron por 72 h a 37°C y 5% de CO₂, una vez transcurrido el tiempo se retiró el medio para colocar medio fresco y las nanopartículas AuNps, AuK9Nps y AuWBNps funcionalizadas con FITC a la CMI previamente determinada y se incubaron durante la noche. Al siguiente día una cámara se incubó por 3 h a 37°C y 5% de CO₂, mientras que otra cámara se incubó a 4°C como control negativo. Posterior a la incubación se recuperaron los sobrenadantes se realizaron dos lavados con PBS 1x, se quitaron las estructuras para dejar solo los portaobjetos y a cada división se le agregaron 15 µL medio de montaje Fluoromount-G™ con DAPI de Thermo Fisher Scientific para ser observados por microscopía confocal en un microscopio Leica DMI8. Con ayuda del software LAS X para ajustar parámetros y tomar las micrografías.

7.2.3 Ensayos sobre células MH-S infectadas con cepas de Mtb

7.2.4.1 Bacteriolisis

En placas de 96 pozos se sembraron 10,000 células un día previo a la infección. Los cultivos se infectaron a una MOI de 1:5 en RPMI y se incubaron por una hora agitando

cada 15 min para favorecer la internalización de las bacterias en los macrófagos. Una vez transcurrido el tiempo se realizaron 3 lavados con RPMI-antibiótico 1%, se retiró y se colocaron 200 μ L de medio completo con las partículas a la CMI determinada. Este ensayo se realizó para observar el efecto que tienen las partículas a diferentes tiempos de incubación, la metodología descrita a continuación se realizó a las 24, 48 y 72 h post infección.

Transcurrido el tiempo en el que se deseó evaluar el efecto de las nanopartículas se lisaron las células con 100 μ L de SDS al 0.1% en 7H9, se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se agregó 100 μ L de Sero-albúmina bovina (SAB) al 20% en 7H9, se homogenizó por pipeteo y se realizaron diluciones seriadas 1:10 en medio 7H9 con OADC para sembrar 10 μ L por duplicado de cada dilución en placas de medio 7H11. Las placas se incubaron y determinaron las UFCs como en la metodología descrita para la MIC. Los datos se capturaron en el software PRISM 8 para la representación gráfica y se realizó el análisis estadístico ANOVA de una vía para determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

7.2.4.1.1 Obtención de sobrenadantes para cuantificación de TNF por ELISA

El medio condicionado de las células infectadas con Mtb y tratadas con las nanopartículas se recuperó en tubos Eppendorf de 500 μ L, se centrifugaron a 15,000 rpm y se colocó en tubos Eppendorf nuevos evitando extraer el pellet. Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C para su posterior uso en la determinación de TNF.

7.2.5 Cuantificación de TNF por ELISA

Para cuantificar el TNF producido por los macrófagos infectados con Mtb y tratados con las nanopartículas se utilizó el kit BD OptEIA™ Set Mouse TNF No. de catálogo 555268,

siguiendo las especificaciones en el inserto. Para los lavados requeridos se utilizó el equipo Wellwash™ Microplate Washer de Thermo Fisher Scientific.

8 RESULTADOS

8.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas de oro

8.1.1 Obtención de las Nanopartículas

Al realizar la reacción de reducción de las nanopartículas de oro con los péptidos antimicrobianos, encontramos que el péptido por sí solo no es capaz de reducir de forma eficiente la sal cloroáurica, ya que se obtienen pocos puntos de nucleación con concentraciones muy altas del péptido, por lo cual se probamos un agente reductor más efectivo. Por las propiedades fisicoquímicas del quitosano previamente descritas en antecedentes, lo utilizamos como agente reductor y estabilizador de la reacción para obtener las nanopartículas de oro control (AuNps), en las cuales a partir de una concentración 3:1 (HAuCl₄: Qts 1% LMW) se obtuvo una solución de color rojo intenso de las partículas control (fig. 16) y un color rojo/vino en las partículas reducidas con quitosano previamente agitado con el péptido, observando una diferencia en el color de las partículas con WB (AuWBNps) ligeramente moradas y K9 (AuK9Nps) con un tono rojizo.

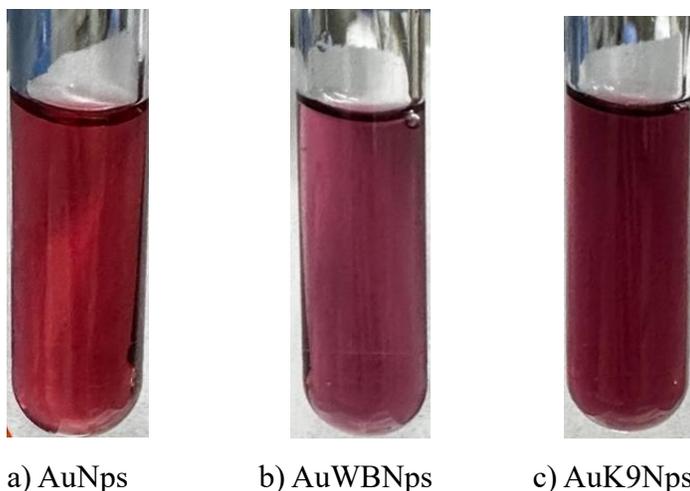


Fig. 16. Nanopartículas obtenidas a partir de la modificación del método Turkevich utilizando a) quitosano de bajo peso molecular al 1% (nanopartículas control); b) quitosano al 1% con catelicidina de búfalo de agua (AuWBNps); c) quitosano al 1% con catelicidina de canino (AuK9Nps).

8.1.2 Plasmón de Resonancia Superficial (PRS)

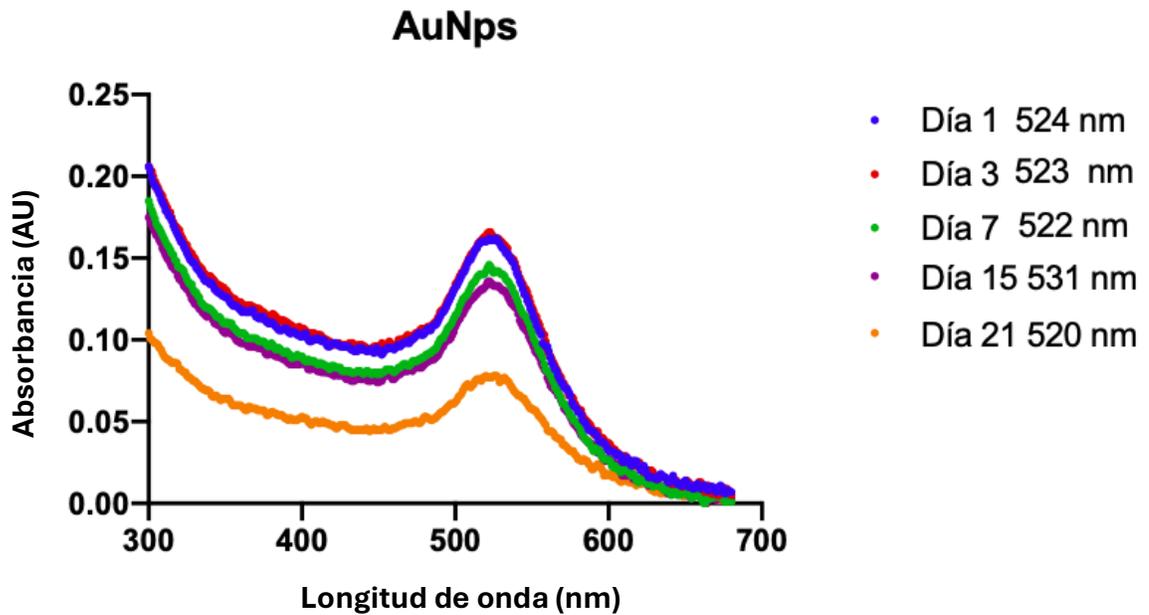


Fig. 17. Plasmón de Resonancia Superficial (PRS) de las nanopartículas control. Día 1 en azul, donde se observa la mayor intensidad a 524 nm; día 7 en rojo, donde se observa la mayor intensidad a 522 nm; día 15 en morado, donde se observa la mayor intensidad a 520 nm.

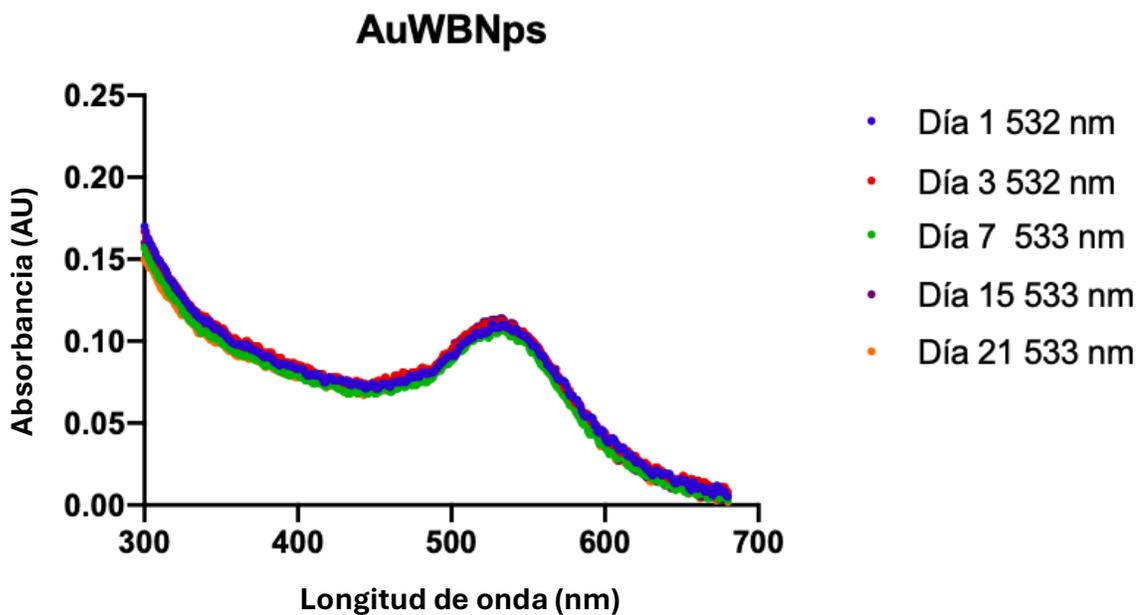


Fig. 18. Plasmón de Resonancia Superficial (PRS) de las nanopartículas con WBCATH. Día 1 en azul, donde se observa la mayor intensidad a 532 nm; día 3 en naranja, donde se observa la mayor intensidad a 532 nm; día 1, donde se observa la mayor intensidad a 533 nm.

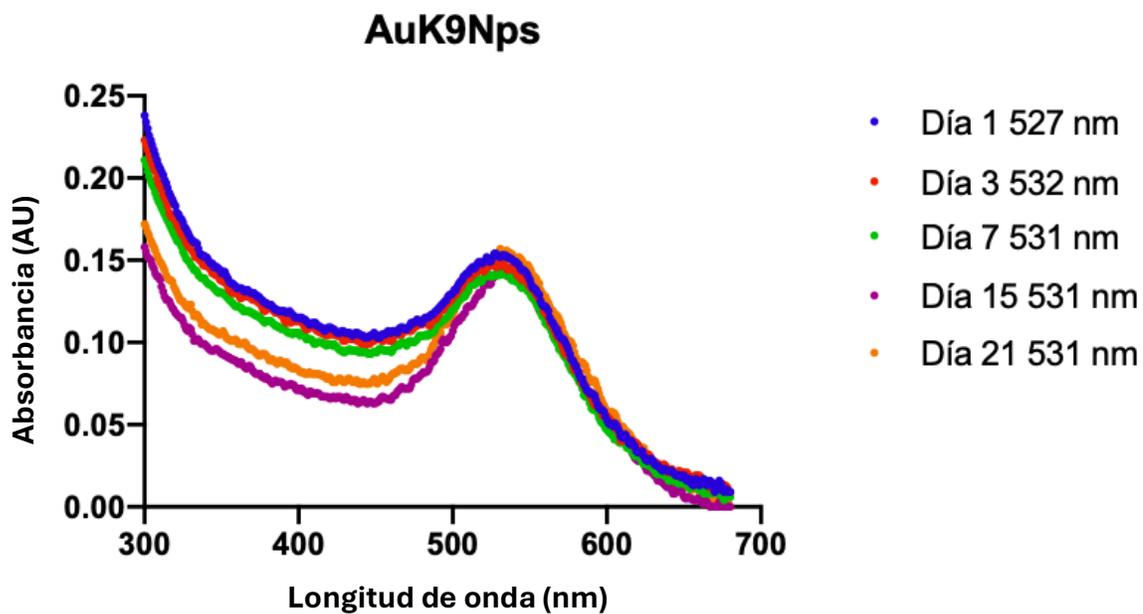


Fig. 19. Plasmón de Resonancia Superficial (PRS) de las nanopartículas con K9CATH. Día 1 en azul, donde se observa la mayor intensidad a 527 nm; día 1 en azul, donde se observa la mayor intensidad a 527 nm; día 1, donde se observa la mayor intensidad a 532 nm al día 3.

8.1.3 Tamaño, Potencial Z y PDI

Las nanopartículas se caracterizan a lo largo del tiempo debido a que esto nos ayuda a evaluar su estabilidad y predecir su vida media.

Tabla 1. Características de las nanopartículas de oro control a diferentes días en donde se observa el tamaño promedio, índice de polidispersidad y Potencial Z. Las gráficas se muestran en el anexo 1.

Tiempo (d)	Tamaño (nm)	PDI (PI)	Potencial Z (mV)
1	103.7 nm	0.26	28.48
3	78.75 nm	0.19	26.28
7	79.12 nm	0.22	28.29
15	64.94 nm	0.24	34.83
21	83.6 nm	0.20	34.84

Tabla 2. Características de las nanopartículas de oro con WBCATH a diferentes días en donde se observa el tamaño promedio, índice de polidispersidad y Potencial Z. Las gráficas se muestran en el anexo 2.

Tiempo (d)	Tamaño (nm)	PDI (PI)	Potencial Z (mV)
1	89.37	0.35	46.71
3	125.5	0.26	45.41
7	92.31	0.32	44.98
15	81.13	0.44	39.11
21	92.73	0.29	38.8

Tabla 3. Características de las nanopartículas de oro con K9CATH a diferentes días en donde se observa el tamaño promedio, índice de polidispersidad y Potencial Z. Las gráficas se muestran en el anexo 3.

Tiempo (d)	Tamaño (nm)	PDI (PI)	Potencial Z (mV)
1	83.99	0.27	34.74
3	91.98	0.33	36.52
7	95.51	0.34	35.75
15	72.68	0.71	26.99
21	95.07	0.20	29.01

8.2 Determinación de la viabilidad celular

Se realizaron los ensayos de citotoxicidad en las líneas celulares MH-S y A549 únicamente con las partículas control y las partículas con WB debido a que la disponibilidad de K9 fue limitada.

8.2.1 Viabilidad de MH-S

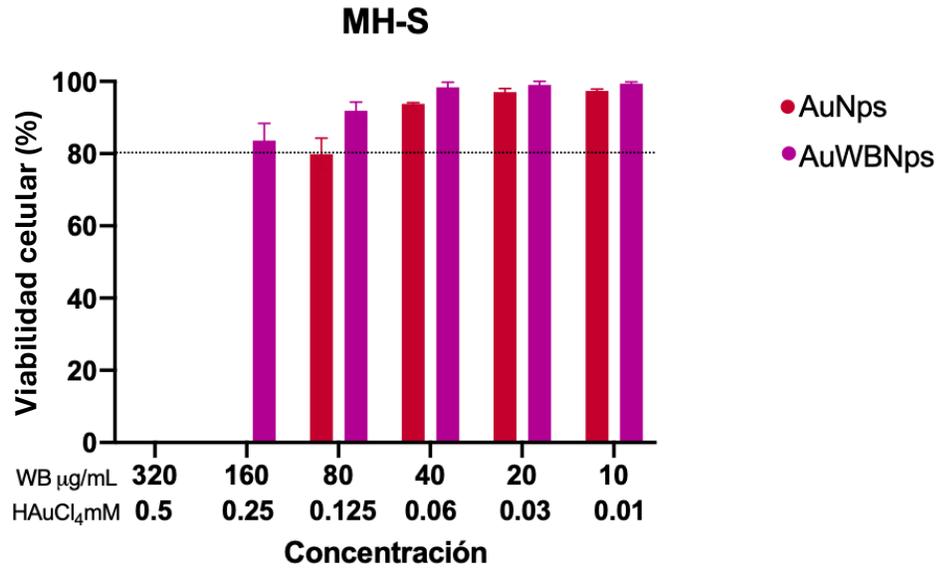


Fig. 20. Porcentaje de viabilidad de macrófagos alveolares en donde se observa que AuWBNps muestra una viabilidad de mayor a 80% a 160 µg/mL-0.25 mM, mientras que las nanopartículas control muestran viabilidad mayor al 80% hasta 0.06 mM. Este ensayo se realizó por cuadruplicado.

8.2.2 Viabilidad de A549

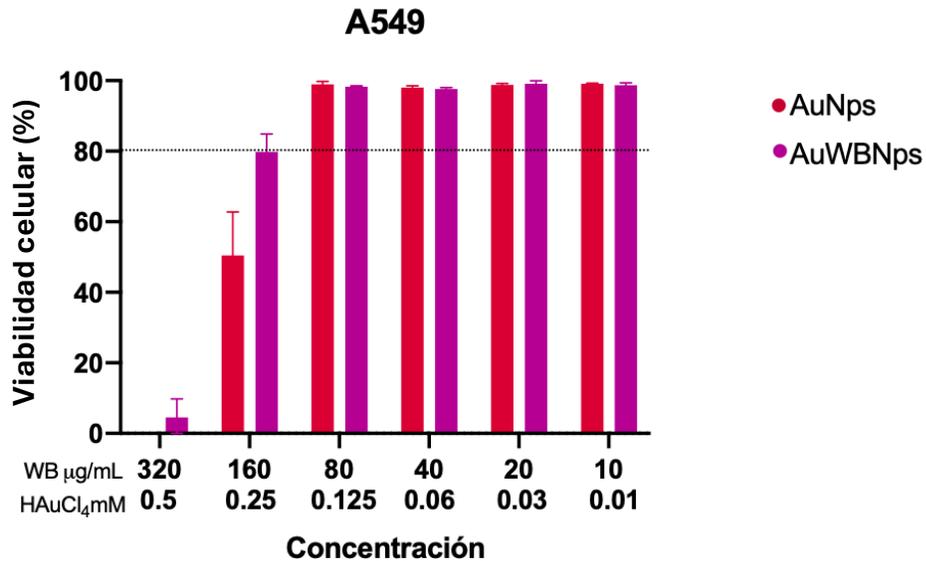


Fig. 21. Porcentaje de viabilidad de neumocitos tipo II en donde se observa que las partículas control y con péptido muestran una viabilidad de mayor a 80% a 80 µg/mL-1.25 mM. Este ensayo se realizó por cuadruplicado

8.3 Determinación de la CMI

Definimos la concentración mínima inhibitoria como la concentración necesaria de nanopartículas para inhibir el crecimiento de 100,000 UFC/mL en microplacas de 96 pozos. Al iniciar este ensayo se realizó un control de calidad para saber la cantidad de bacterias inoculadas, en el que teóricamente son 100,000 por 100 μ L. Para este ensayo obtuvimos un conteo de 177,500 UFC en 100 μ L para la cepa H37Rv y 87,500 UFC en 100 μ L para la cepa MDR. Estos datos se utilizaron para calcular la concentración exacta de nanopartículas para determinar la CMI.

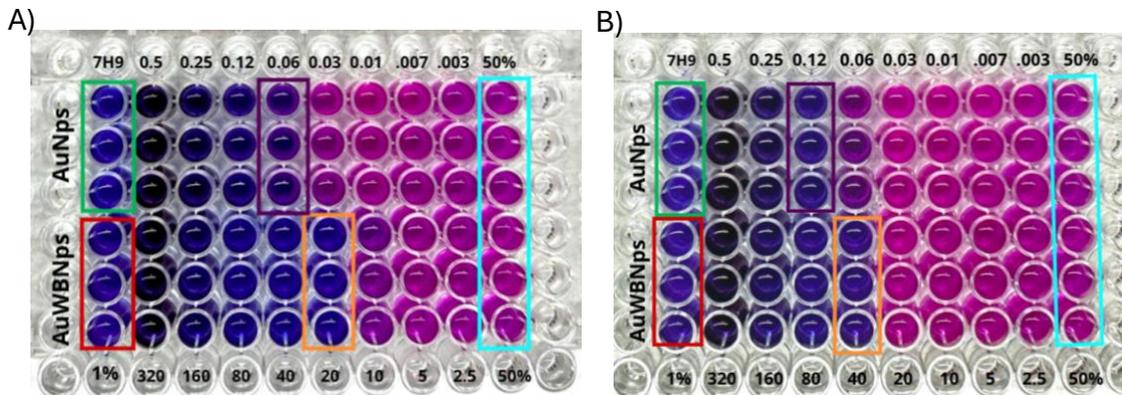


Fig. 22. Ensayo de viabilidad de las cepas de Mtb expuestas a diferentes concentraciones de las nanopartículas. A) Ensayo con la cepa H37Rv; B) Ensayo con la cepa MDR. Este ensayo se realizó por cuadruplicado

Verde: control de medio de cultivo; rojo: control 1% de bacteria; morado: CMI obtenida de las nanopartículas control (AuNps); naranja: CMI obtenida de las nanopartículas con péptido WBCATH (AuWBNps); Azul claro: control 50% de bacteria.

En las figuras 24 y 25 se muestra que para la cepa H37Rv obtuvimos una reducción del 95.78% en contraste con nuestro control al 50% de bacteria utilizando la concentración 0.03 mM – 20 μ g/mL de las AuWBNps y un 98.85% de reducción al utilizar las nanopartículas control (AuNps) a 0.06 mM. Por otra parte para la cepa CIBIN99 MDR se obtuvo un porcentaje de reducción de 63.44 % de las AuNps en una concentración de 0.12 mM y de 40.43% de las AuWBNps en una concentración de 0.06 – 40 μ g/mL.

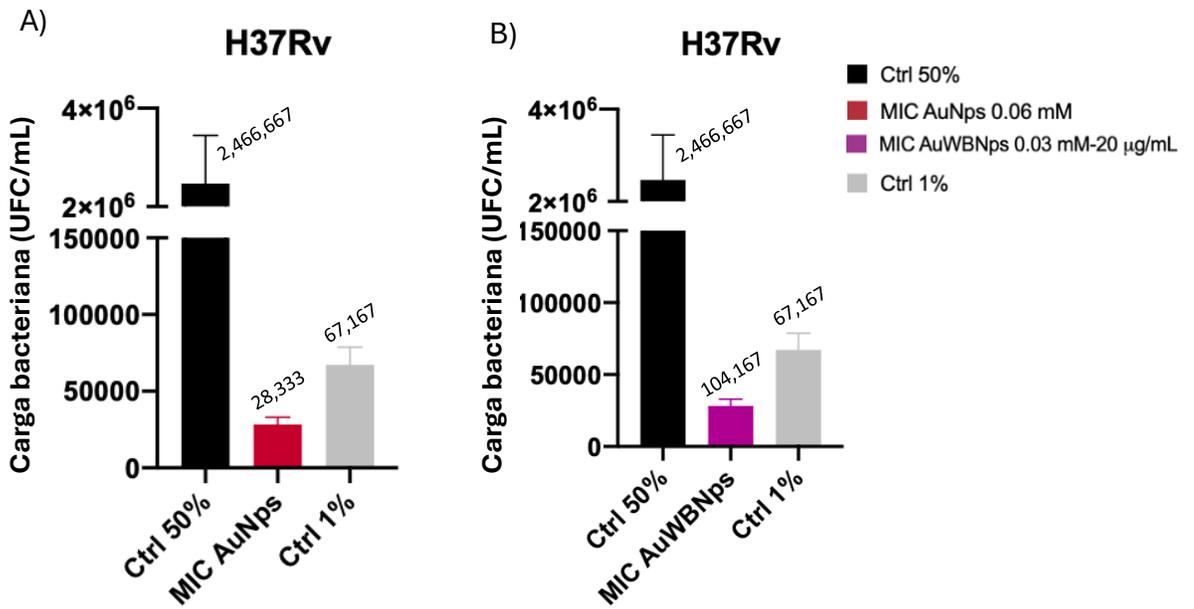


Fig. 23. UFC/mL contadas en los pocillos seleccionados de la figura 23A. A) AuNps; B) AuWBNps.

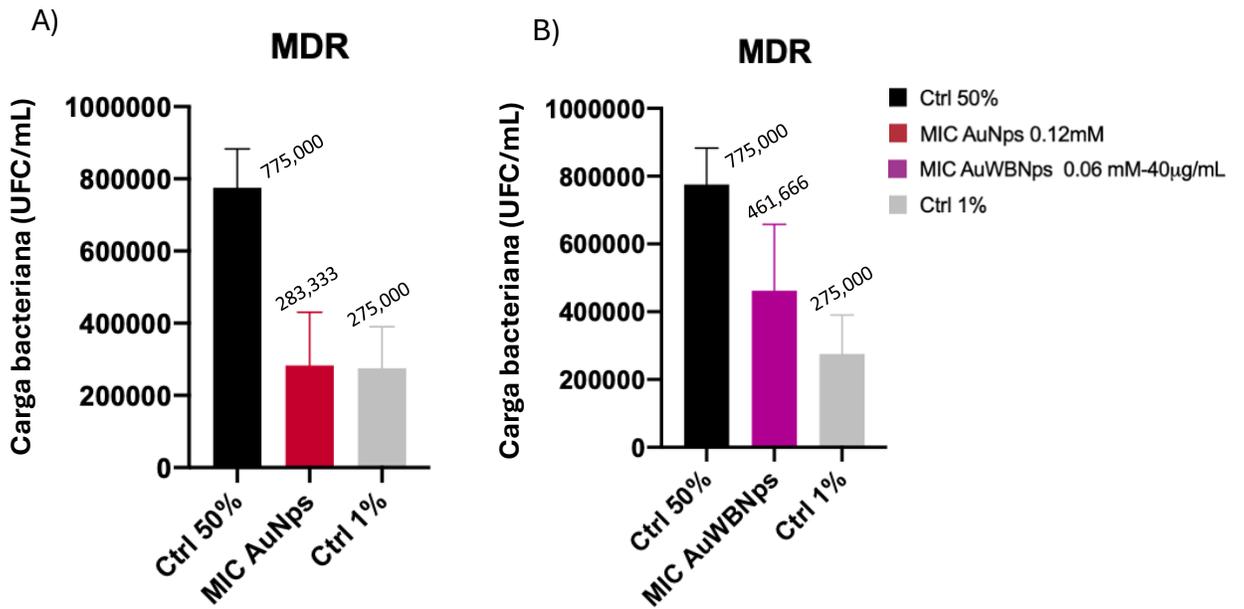


Fig. 24. UFC/mL contadas en los pocillos seleccionados de la figura 23B. A) AuNps; B) AuWBNps.

Con los valores obtenidos se realizó una regla de tres para determinar la cantidad exacta de partículas necesarias para inhibir a 100,000 bacterias por 100 μL .

H37Rv Stanford

177,500 UFC/100 μL – 0.03mM - 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$

100,000 UFC/100 μL – X

En donde X es la concentración que buscamos.

177,500 UFC/100 μL – 0.03mM - 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$

100,000 UFC/100 μL – 0.017mM - 11.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$

X= 0.017mM - 11.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$

CIBIN99 MDR

87,500 UFC/100 μL – 0.06mM - 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$

100,000 UFC/100 μL – X

En donde X es la concentración que buscamos.

87,500 UFC/100 μL – 0.06mM - 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$

100,000 UFC/100 μL – 0.068mM - 45.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$

X= 0.068mM - 45.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Por lo que para inhibir el crecimiento bacteriano de 100,000 bacterias por 100 μL para la cepa H37Rv se requiere una concentración de 0.017 mM - 11.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mientras que para

la cepa MDR 0.068 mM - 45.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las nanopartículas con WB. Estas concentraciones se utilizaron para los ensayos posteriores.

8.4 Captación celular de las nanopartículas en la línea celular MH-S

Para observar la interacción de las nanopartículas con los macrófagos alveolares se realizó una microscopía confocal. En las micrografías obtenidas se observan las nanopartículas marcadas con FITC y núcleos celulares marcados con DAPI. En el experimento se utilizaron las concentraciones teóricas obtenidas en la CMI, mismas que se utilizaron para el ensayo de bacteriólisis posteriormente. Para ambas simulaciones nuestro control negativo fueron las células expuestas al frío mientras se exponían a nuestras partículas.

En este ensayo además de utilizar las AuNps y AuWBNps se agregó el tratamiento con AuK9Nps utilizando la misma concentración obtenida en la MIC para AuWBNps. En las micrografías de simulación de células infectadas con H37Rv, incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 3 h (fig. 25), se observaron las nanopartículas cerca de los núcleos celulares delimitadas por lo que pareciera ser alguna estructura celular; se observa una intensidad mayor de FITC en los tratamientos con las partículas AuNps y AuK9Nps. En cuanto a los macrófagos expuestos al frío (fig 26) se siguió observando interacción con las partículas aunque en menor cantidad.

En las micrografías de simulación de células infectadas con MDR, incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 3 h (fig. 27) se observó una concentración muy alta de las nanopartículas distribuidas de forma homogénea en los campos representativos por lo que no se alcanzó a diferenciar una interacción. Los núcleos celulares se observaron irregulares. En los macrófagos expuestos al frío (fig. 28) se observó interacción de las células con las nanopartículas cerca de los núcleos y similar a la simulación con H37Rv, delimitadas por lo que parecieran ser estructuras celulares.

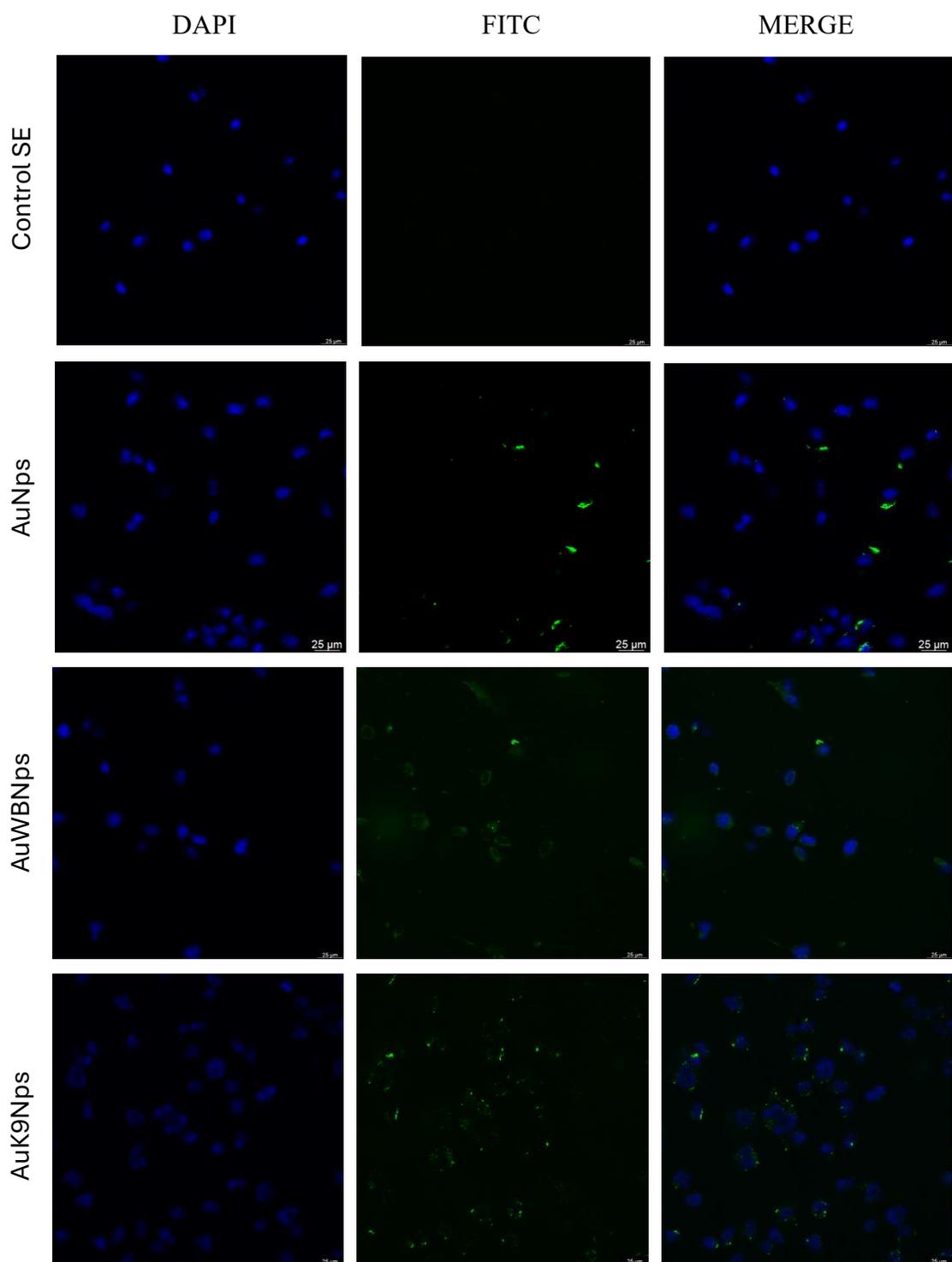


Fig. 25. Micrografías de macrófagos expuestos a las nanopartículas a la CMI obtenida para H37Rv por 3 h incubados a 37°C y 5% de CO₂. Aumento: 40x, microscopio Leica DMI8, software LAS X.

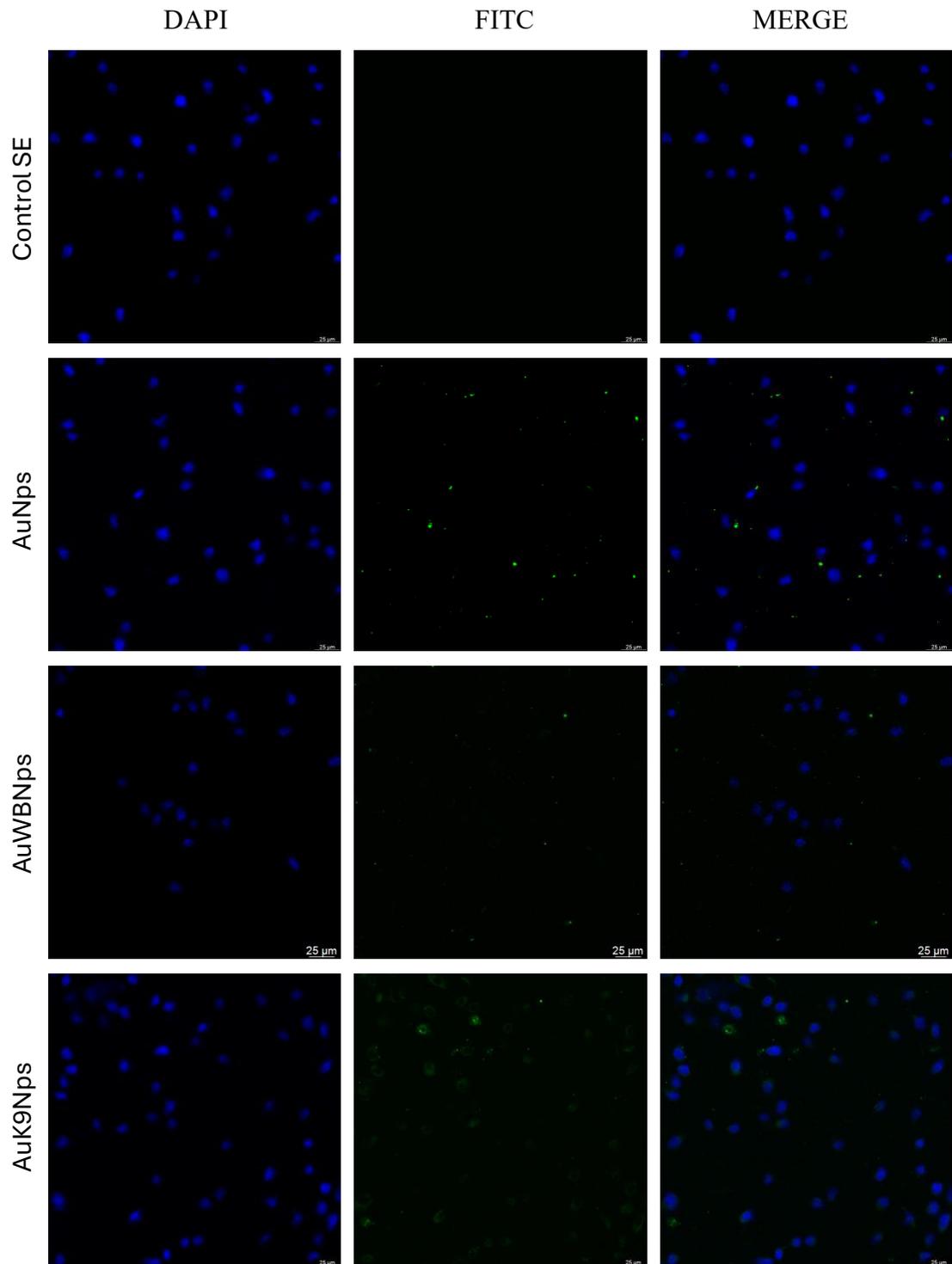


Fig. 26. Micrografías de macrófagos expuestos a las nanopartículas a la CMI obtenida para H37Rv incubados por 3 h a 4°C. Aumento: 40x, microscopio Leica DMI8, software LAS X

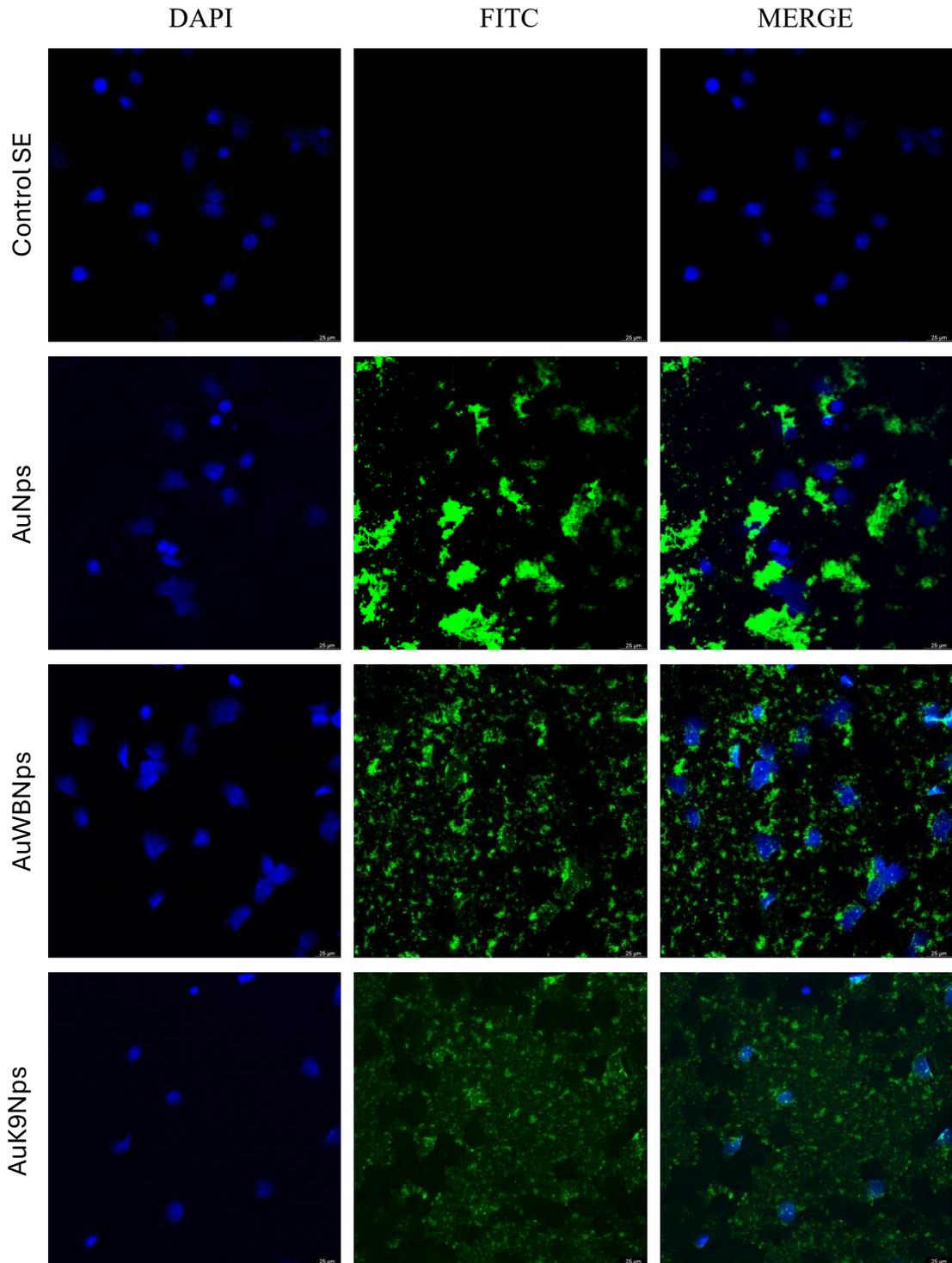


Fig. 27. Micrografías de macrófagos expuestos a las nanopartículas a la CMI obtenida para MDR incubados por 3 h a 37°C y 5% de CO₂. Aumento: 40x, microscopio Leica DMi8, software LAS X

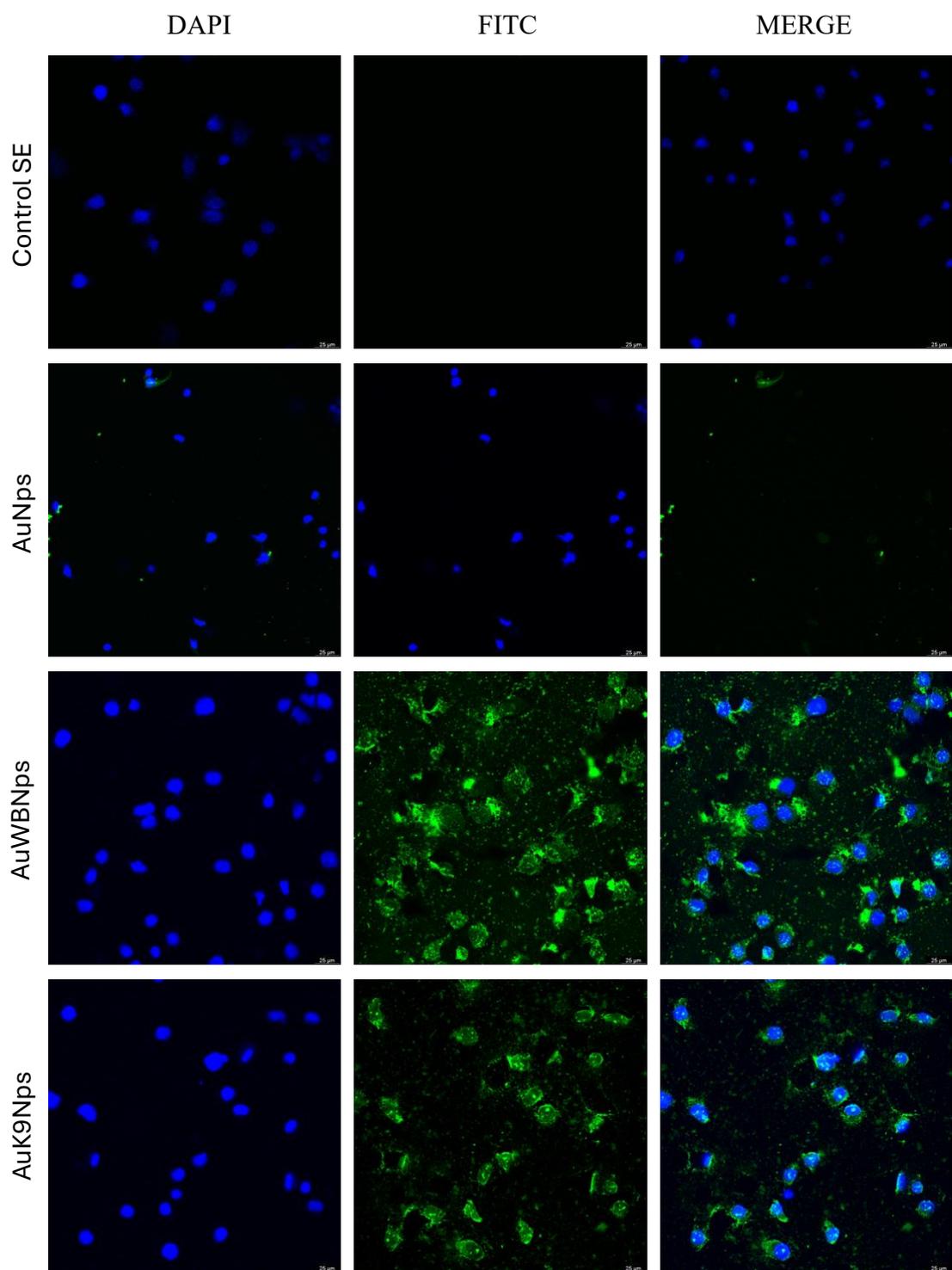


Fig. 28. Micrografías de macrófagos expuestos a las nanopartículas a la CMI obtenida para MDR incubados por 3 h a 4°C. Aumento: 40x, microscopio Leica DMI8, software LAS X.

8.4 Bacteriolisis

Una vez que se estableció el modelo *in vitro* del tratamiento con nanopartículas de los macrófagos y se estableció el tipo de interacción de las diferentes nanopartículas con las células, procedimos al ensayo de infección y tratamiento de las células infectadas con nanopartículas a diferentes tiempos de incubación.

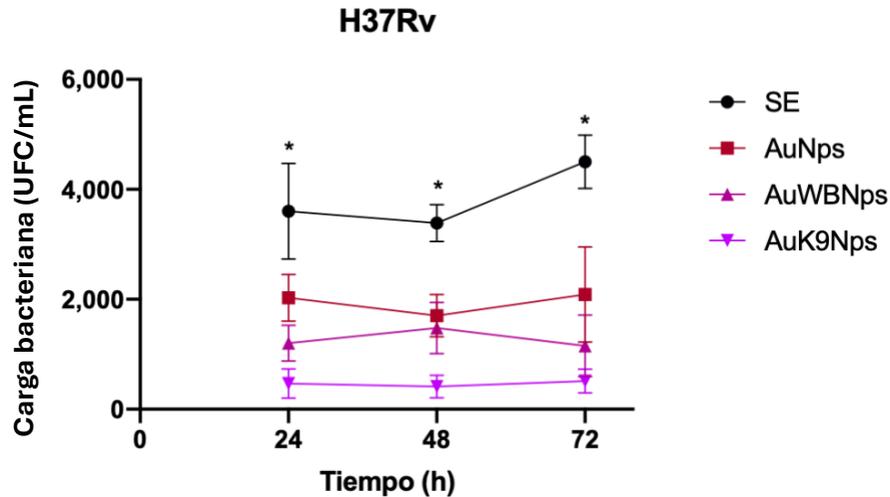


Fig. 29. Evaluación de la carga bacteriana de la cepa H37Rv en macrófagos alveolares tratados con las nanopartículas, en donde se observan diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo control.

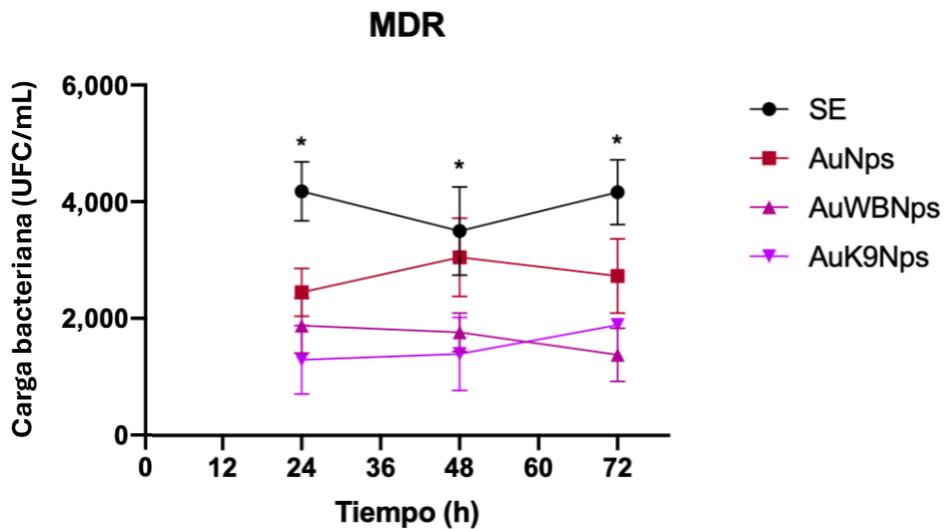


Fig. 30. Evaluación de la carga bacteriana de la cepa MDR en macrófagos alveolares tratados con las nanopartículas, en donde se observan diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo control.

8.5 Expresión de TNF producidas en Killing

Los sobrenadantes de los cultivos infectados se recuperaron y se analizó la producción de factor de necrosis tumoral (TNF). En la figura 32 se muestra que no hubo diferencias significativas en la producción de TNF entre los diferentes tratamientos.

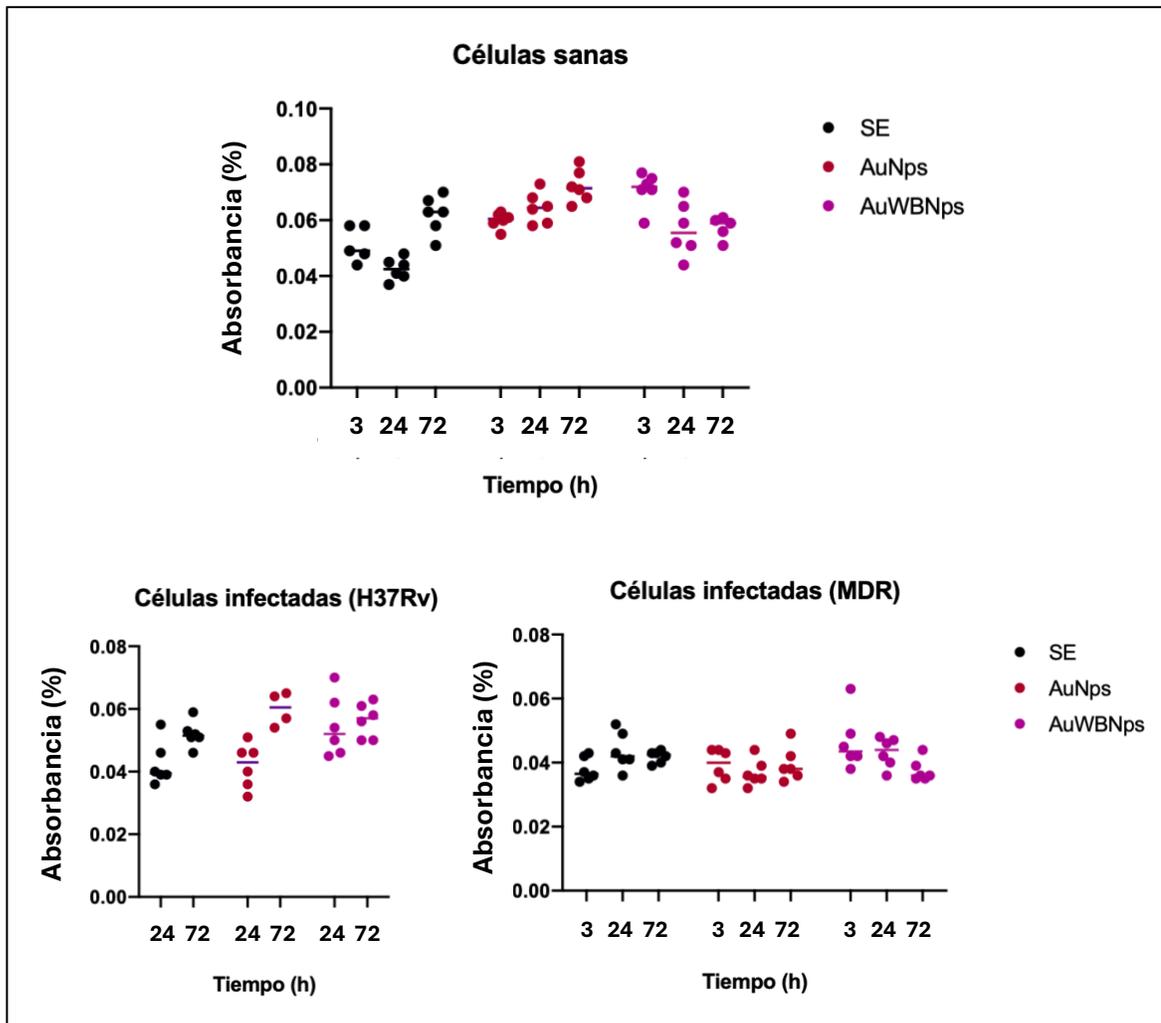


Fig. 31. Análisis de la producción de TNF en macrófagos infectados con Mtb y tratados con nanopartículas. Los valores se expresan en absorbancia a 450 nm ya que estos estuvieron por debajo de la curva estándar. (Anexo 4).

9. DISCUSIÓN

Estudios previos han demostrado la utilidad del quitosano en la síntesis de nanopartículas (Nps) de oro, confiriéndole estabilidad y favoreciendo su biodisponibilidad (Fuster et al, 2020; Saravanakumar et al, 2020). En el presente trabajo, sintetizamos nanopartículas de oro con quitosano de bajo peso molecular y los péptidos antimicrobianos (PAM) WBCATH (de búfalo de agua) y K9CATH (canino). Estos PAMs poseen pocos grupos donadores de electrones, lo que dificulta la síntesis de nanopartículas sin el quitosano. Obtuvimos tres tipos de nanopartículas: AuNps (control), AuWBNps (conteniendo WBCATH) y AuK9Nps (conteniendo K9CATH).

La síntesis de las nanopartículas se confirmó por la presencia de nucleaciones metálicas, identificadas por un plasmón de resonancia superficial (PRS), fenómeno físico que ocurre cuando los electrones de una capa metálica se excitan (Raguindin & Mercado, 2023). Los plasmones identificados tuvieron picos a una longitud de onda entre 520 a 533 nm, lo que concuerda con lo reportado para nanopartículas de oro (Osorio-Anaya et al, 2019; Liao et al, 2020; Koushki et al, 2021). Las intensidades de los PRS variaron entre las partículas, siendo AuWBNps las que presentaron menor intensidad. Las variaciones de los PRS están influenciadas por la forma, tamaño o la cantidad de moléculas no metálicas que rodean la partícula, mientras que corrimientos en los picos de las longitudes de onda se relacionan con el tamaño de las partículas (Hussain et al, 2020).

Los tamaños promedio que obtuvimos de las tres nanopartículas rondan desde los 64 hasta 125 nm, cambiando a lo largo de los días, en el caso de las partículas con péptido observamos dos poblaciones (Anexo 2 y 3) en donde para AuWBNps observamos poblaciones de nanopartículas pequeñas que van desde los 7 a los 30 nm a lo largo de los días, mientras que para AuK9Nps de 6 a 34 nm. El observar diferentes tipos de poblaciones de partículas en una misma síntesis puede ser benéfico para nuestra investigación debido a que está reportado que las nanopartículas tienen diferentes efectos dependiendo de su tamaño, tamaños ≤ 50 nm están relacionados con baja citotoxicidad y

alta captación celular, mientras que tamaños ≥ 51 nm están relacionados con retención celular, mayor diferenciación y viabilidad celular, así como mayor captación (Vázquez-Guevara & Moreno, 2022).

Por otra parte los potenciales Z de las nanopartículas fueron ≤ 26 mV indicando buena predicción de estabilidad en la síntesis (Pochapski et al, 2021), observando mayor positividad en las nanopartículas AuWBNps, resultado que se correlaciona con el PRS observado, lo que podría sugerir que debido a que los péptidos antimicrobianos son moléculas con cargas altamente positivas podría haber mayor interacción de éstos con las nucleaciones metálicas, lo cual podría ser beneficioso en la internalización de las nanopartículas a las células como se discutirá más adelante.

En cuanto a los ensayos *in vitro*, las nanopartículas AuNps mostraron no ser tóxicas a una concentración de 0.06 mM para la línea celular MH-S y a una concentración de 0.125 mM para la línea A549. Las AuWBNps demostraron no ser tóxicas a una concentración de 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de péptido y 0.25 mM de HAuCl_4 en el que se observó un porcentaje de viabilidad mayor a 80% en macrófagos alveolares, Barrios-Palacios y colaboradores (2023), demostraron que WBCATH no es tóxico a 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otra parte para neumocitos tipo II, Uboldi y colaboradores (2009) mencionan que las nanopartículas de oro son citotóxicas para la línea celular A549 a partir de la concentración 0.7mM, en contraste, nuestras nanopartículas comenzaron a ser tóxicas para esta línea a partir de la concentración 0.125 mM. *Debido a la limitada cantidad del péptido K9CATH no se realizó el ensayo de citotoxicidad y se tomó la toxicidad ejercida por AuWBNps como referencia.

Una propiedad importante para que estas nanopartículas sean útiles es que inhiban el crecimiento bacteriano. Primero determinamos la CMI *in vitro* sobre Mtb. en donde encontramos que se requiere una concentración de 11.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de WBCATH - 0.017 mM de HAuCl_4 para inhibir en un 98.85% el crecimiento bacteriano de la cepa H37Rv y 45.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de WBCATH - 0.068 mM de HAuCl_4 para inhibir en un 40.43% el crecimiento bacteriano de la cepa MDR. Barrios-Palacios y colaboradores (2023) reportaron que la

MIC de WBCATH para reducir el crecimiento bacteriano a 85.60% es de 64 $\mu\text{g/mL}$, mientras que para MDR reportaron que la misma concentración reducía 98% el crecimiento bacteriano comparado con su grupo control, en donde podemos destacar que el péptido fue más eficiente para la cepa MDR mientras que en nuestro estudio fue más eficiente para H37Rv logrando reducir 5 veces la concentración de péptido necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano.

Utilizando la misma concentración de nanopartículas correspondiente para la CMI determinada, analizamos la internalización de las nanopartículas en la línea celular MH-S de macrófagos alveolares por microscopía confocal. Las micrografías muestran los núcleos celulares marcados con DAPI y alrededor de ellos las nanopartículas marcadas con FITC delimitados por lo que pareciera ser una membrana celular. En el perímetro de las células no se observan marcas de FITC (Fig. 26 a 29). Para comprobar que las nanopartículas se internalizaron utilizamos un control negativo de macrófagos alveolares expuestos al frío; en este caso, se observa una menor cantidad de marcas de FITC en las células en contraste con los grupos de incubación a 37°C, 5% CO₂, también se observó mayor marca de FITC en las nanopartículas AuK9Nps lo que podría estar relacionado a que en esta síntesis existe una población mayor de nanopartículas más pequeñas (anexo 3) en contraste con las AuWBNps y AuNps (anexo 2 y 1) Jarai y Fromen (2022) determinaron que gran parte de las nanopartículas de oro se internalizan por fagocitosis a la célula y que la exposición al frío inhibe la fagocitosis, por lo cual, podemos inferir que las poblaciones más pequeñas de nanopartículas se internalizan a las células por una vía independiente a la fagocitosis como Srijampa y colaboradores (2020) reportaron que nanopartículas ~15 nm pueden ser internalizadas de diferentes formas dependiendo del tamaño y que las nanopartículas con cargas superficiales positivas se internalizan mejor que la que tienen cargas superficiales negativas. Por otra parte, en las micrografías obtenidas para la concentración que inhibe MDR no logramos determinar interacciones intracelulares en la condición de incubación a 37°C y 5% de CO₂, ya que las nanopartículas se observan homogéneas en los campos debido a la alta concentración, sin embargo, la incubación en frío si nos permitió observar interacción, visualizando núcleos rodeados las nanopartículas. A esta última concentración también se observaron núcleos amorfos y con

prolongaciones, lo cual podría sugerir presencia de trampas extracelulares de macrófagos según Bartneck y colaboradores (2010) en donde describieron procesos de eliminación de nanopartículas de oro independientes de fagocitosis en células innatas.

Posteriormente analizamos el efecto de las nanopartículas sobre las bacterias infectando macrófagos a diferentes tiempos de incubación. Los tres tipos de nanopartículas fueron efectivos en reducir la carga bacteriana de las dos cepas de Mtb en todos los tiempos de incubación (Fig 30 y 31).

Es importante resaltar que las nanopartículas de oro sin péptido tienen buena actividad antimicrobiana mostrando diferencia significativa solo contra AuK9Nps en ambas cepas a las 24 y 48 h, y con AuWBNps en MDR a las 24 y 72 h, esto podría deberse a que la concentración a la cual están sintetizadas las nanopartículas es muy baja en contraste con la concentración de quitosano, y que, según Fuster y colaboradores (2020) las nanopartículas reducidas con quitosano a altas concentraciones producen un efecto antimicrobiano altamente significativo en contraste con sus grupos control en bacterias gram positivas y negativas de importancia clínica, por lo que una de las perspectivas de este trabajo es aumentar la catelicidina cargada en las partículas y disminuir el quitosano para evaluar si hay un mejor efecto.

A partir de los ensayos comentados en el párrafo anterior, se cuantificó la producción de TNF en el sobrenadante de los cultivos infectados mediante la técnica de ELISA. Todos los valores determinados fueron menores a los obtenidos en la curva estándar. Existe la probabilidad de que sí haya producción de TNF pero no se haya secretado, esto queda para un estudio posterior donde se determine el TNF intra y extracelular. De acuerdo a Srijampa y colaboradores (2020) la carga superficial de las nanopartículas modula la producción de citocinas por las células: las nanopartículas con cargas superficiales negativas están relacionadas a la producción de TNF, mientras que las nanopartículas con cargas superficiales positivas están relacionadas con la producción de TGF- β e IL-1 β . Barrios-Palacios (2023) encontraron diferencias significativas en la producción de TNF después

de exponer WBCATH a 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a macrófagos alveolares por 24 h, es decir, utilizando cinco veces la concentración de péptido a la que utilizamos en este trabajo.

10. CONCLUSIÓN

Logramos acoplar péptidos antimicrobianos a nanopartículas de oro obteniendo una síntesis estable y polidispersa, con tamaños desde 64 a 125 nm y potenciales Z de 26 a 46 mV. Las nanopartículas obtenidas tienen actividad inhibitoria sobre Mtb con una CMI de 11.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 0.017 mM para H37Rv Stanford y de 45.71 - 0.068 mM para CIBIN99 MDR sin ser tóxicas desde 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 0.125 mM. Demostramos que las nanopartículas se internalizan en macrófagos alveolares y altas concentraciones provocan que los núcleos pierdan su morfología y que muestran actividad anti-Mtb en un modelo *in vitro* de macrófagos infectados con Mtb.

11. PERSPECTIVAS

- Reducir la cantidad de quitosano como agente reductor y aumentar la cantidad de péptidos antimicrobianos en la síntesis para obtener mayores diferencias significativas entre los tratamientos.
- Evaluar por microscopía electrónica de transmisión (MET) la internalización de nanopartículas.
- Utilizar un marcador de citoesqueleto en la microscopía confocal.
- Observar el efecto de las nanopartículas sobre las micobacterias por MET.
- Evaluar un panel más amplio de citocinas en el ensayo bacteriólisis.
- Evaluar muerte celular en los macrófagos durante el ensayo bacteriólisis.
- Evaluar marcadores de apoptosis y autofagia en el ensayo bacteriólisis.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Ajesh, K., & Sreejith, K. (Eds.). (2022). *Antimicrobial Peptides: Challenges and Future Perspectives*. Elsevier.
2. Alford, M. A., Baquir, B., Santana, F. L., Haney, E. F., & Hancock, R. E. (2020). Cathelicidin host defense peptides and inflammatory signaling: Striking a balance. *Frontiers in microbiology*, *11*, 1902.
3. Anwar, AY, Handayani, MTP, Nurdin, E., Berliana, I., Lewa, HI y Artati, A. (2023). Comparación del examen de tuberculosis mediante el método de Ziehl-Neelsen y la prueba rápida molecular. *Jurnal Kesehatan Manarang* , *9* (3), 215-221.
4. Bartneck, M., Keul, HA, Zwadlo-Klarwasser, G., y Groll, J. (2010). Aclaramiento de nanopartículas extracelulares independiente de la fagocitosis por células inmunitarias humanas. *Nano letters* , *10* (1), 59-63.
5. Bhattacharya, B., Xiao, S., Chatterjee, S., Urbanowski, M., Ordonez, A., Ihms, EA, ... & Kramnik, I. (2021). La respuesta integrada al estrés media la necrosis en los granulomas de *Mycobacterium tuberculosis* murino. *El Diario de investigación clínica* , *131* (3).
6. Boletín Epidemiológico. Salud Publica Mex [Internet]. 02 de septiembre de 2024. Semana Epidemiológica 34. [citado 04 de septiembre de 2024];8(4):679_684. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-355523>
7. Bussi, C., & Gutierrez, M. G. (2019). *Mycobacterium tuberculosis* infection of host cells in space and time. *FEMS microbiology reviews*, *43*(4), 341-361.
8. Carabalí-Isajar, M. L., Rodríguez-Bejarano, O. H., Amado, T., Patarroyo, M. A., Izquierdo, M. A., Lutz, J. R., & Ocampo, M. (2023). Clinical manifestations and immune response to tuberculosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *39*(8), 206.

9. Carranza, C., Pedraza-Sanchez, S., de Oyarzabal-Mendez, E., & Torres, M. (2020). Diagnosis for latent tuberculosis infection: new alternatives. *Frontiers in immunology*, *11*, 2006.
10. Chandra, P., Grigsby, S. J., & Philips, J. A. (2022). Immune evasion and provocation by Mycobacterium tuberculosis. *Nature Reviews Microbiology*, *20*(12), 750-766.
11. De Martino, M., Lodi, L., Galli, L. y Chiappini, E. (2019). Respuesta inmune a Mycobacterium tuberculosis: una revisión narrativa. *Fronteras en pediatría* , *7* , 350.
12. Dheda, K., Perumal, T., Moultrie, H., Perumal, R., Esmail, A., Scott, A. J., ... & Pai, M. (2022). The intersecting pandemics of tuberculosis and COVID-19: population-level and patient-level impact, clinical presentation, and corrective interventions. *The Lancet Respiratory Medicine*.
13. Dlozi, P. N., Gladchuk, A., Crutchley, R. D., Keuler, N., Coetzee, R., & Dube, A. (2022). Cathelicidins and defensins antimicrobial host defense peptides in the treatment of TB and HIV: Pharmacogenomic and nanomedicine approaches towards improved therapeutic outcomes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *151*, 113189.
14. Dong, J., Carpinone, P. L., Pyrgiotakis, G., Demokritou, P., & Moudgil, B. M. (2020). Synthesis of precision gold nanoparticles using Turkevich method. *KONA Powder and Particle Journal*, *37*, 224-232.
15. Ernst, J. D. (2012). The immunological life cycle of tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, *12*(8), 581-591.
16. Fernandes, G. F., Thompson, A. M., Castagnolo, D., Denny, W. A., & Dos Santos, J. L. (2022). Tuberculosis drug discovery: challenges and new horizons. *Journal of Medicinal Chemistry*, *65*(11), 7489-7531.
17. Fontecha García de Yébenes, M., Márquez De La Plata, L., Navarro Gómez, M. L., Riquelme García, O., & González López, J. L. (2009). Tuberculosis extrapulmonar: mal de Pott. *Acta pediatr. esp*, 189-191.
18. Fuster, M. G., Montalbán, M. G., Carissimi, G., Lima, B., Feresin, G. E., Cano, M., ... & Villora, G. (2020). Antibacterial effect of chitosan-gold nanoparticles

and computational modeling of the interaction between chitosan and a lipid bilayer model. *Nanomaterials*, 10(12), 2340.

19. Giljohann, D. A., Seferos, D. S., Daniel, W. L., Massich, M. D., Patel, P. C., & Mirkin, C. A. (2020). Gold nanoparticles for biology and medicine. *Spherical Nucleic Acids*, 55-90.
20. Goletti, D., Delogu, G., Matteelli, A., & Migliori, G. B. (2022). The role of IGRA in the diagnosis of tuberculosis infection, differentiating from active tuberculosis, and decision making for initiating treatment or preventive therapy of tuberculosis infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 124, S12-S19.
21. Gopaldaswamy, R., Dusthacker, V. A., Kannayan, S., & Subbian, S. (2021). Extrapulmonary tuberculosis—an update on the diagnosis, treatment and drug resistance. *Journal of Respiration*, 1(2), 141-164.
22. Hammami, I., & Alabdallah, N. M. (2021). Gold nanoparticles: Synthesis properties and applications. *Journal of king Saud university-science*, 33(7), 101560.
23. Harriff MJ, Cansler ME, Toren KG, Canfield ET, Kwak S, Gold MC, Lewinsohn DM (2014) Human Lung epithelial cells contain *Mycobacterium tuberculosis* in a late endosomal vacuole and are efficiently recognized by CD8+ T cells. PLoS ONE.
24. Huang, Y., Ai, L., Wang, X., Sun, Z., & Wang, F. (2022). Review and updates on the diagnosis of tuberculosis. *Journal of clinical medicine*, 11(19), 5826.
25. Hussain, M. H., Abu Bakar, N. F., Mustapa, A. N., Low, K. F., Othman, N. H., & Adam, F. (2020). Synthesis of various size gold nanoparticles by chemical reduction method with different solvent polarity. *Nanoscale Research Letters*, 15, 1-10.
26. Jimenez-Arellanes MA, Luna HJ, Cornejo GJ, Lopez GS, Castro MM, Meckes FM, Mata ED, Marquina B, Torres LJ, Hernández Pando R. (2013) Ursolic and oleanolic acids as antimicrobial and immunomodulatory compounds for tuberculosis treatment. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13: 258. doi: 10.1186/1472-6882-13-258.

27. Kalscheuer, R., Palacios, A., Anso, I., Cifuentes, J., Anguita, J., Jacobs Jr, W. R., ... & Prados-Rosales, R. (2019). The Mycobacterium tuberculosis capsule: a cell structure with key implications in pathogenesis. *Biochemical Journal*, 476(14), 1995-2016.
28. Kay, A. W., Ness, T., Verkuyl, S. E., Viney, K., Brands, A., Masini, T., ... & Mandalakas, A. M. (2022). Xpert MTB/RIF Ultra assay for tuberculosis disease and rifampicin resistance in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (9).
29. Khan, MK, Islam, MN, Ferdous, J. y Alam, MM (2019). Una visión general de la epidemiología de la tuberculosis. *Revista médica Mymensingh: MMJ*, 28 (1), 259-266.
30. Koushki, E. (2021). Effect of conjugation with organic molecules on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles and application in optical biosensing. *RSC advances*, 11(38), 23390-23399.
31. Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., ... & He, Q. (2019). The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American journal of translational research*, 11(7), 3919.
32. Liao, G., Liu, X., Yang, X., Wang, Q., Geng, X., Zou, L., ... & Wang, K. (2020). Surface plasmon resonance assay for exosomes based on aptamer recognition and polydopamine-functionalized gold nanoparticles for signal amplification. *Microchimica Acta*, 187(4), 251.
33. Lukácsi, S., Mácsik-Valent, B., Nagy-Baló, Z., Kovács, K. G., Kliment, K., Bajtay, Z., & Erdei, A. (2020). Utilization of complement receptors in immune cell–microbe interaction. *FEBS letters*, 594(16), 2695-2713.
34. Magana, M., Pushpanathan, M., Santos, A. L., Leanse, L., Fernandez, M., Ioannidis, A., ... & Tegos, G. P. (2020). The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(9), e216-e230.
35. Moliva, J. I., Duncan, M. A., Olmo-Fontáñez, A., Akhter, A., Arnett, E., Scordo, J. M., ... & Torrelles, J. B. (2019). The lung mucosa environment in the elderly increases host susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection. *The Journal of infectious diseases*, 220(3), 514-523.

36. Natarajan, A., Beena, PM, Devnikar, AV y Mali, S. (2020). Una revisión sistémica sobre la tuberculosis. *Revista india de tuberculosis* , 67 (3), 295-311.
37. OMS, (2021) Tuberculosis: Datos clave. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
38. Osorio Anaya, A. M., Manrique Fajardo, J. J., & Cornejo Sánchez, Ó. (2019). Estudio teórico del plasmón en nanoesferas de oro. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 85(4), 432-439.
39. Palacios, J. B., Barrios-Payán, J., Mata-Espinosa, D., Lara-Espinosa, J. V., León-Contreras, J. C., Lushington, G. H., ... & Hernández-Pando, R. (2022). In Vitro, In Vivo and In Silico Assessment of the Antimicrobial and Immunomodulatory Effects of a Water Buffalo Cathelicidin (WBCATH) in Experimental Pulmonary Tuberculosis. *Antibiotics*, 12(1), 75.
40. Pérez, F., Méndez, A., Lagos, A., & Vargas, S. L. (2014). Dinámica y patología del barrido mucociliar como mecanismo defensivo del pulmón y alternativas farmacológicas de tratamiento. *Revista médica de Chile*, 142(5), 606-615.
41. Pochapski, D. J., Carvalho dos Santos, C., Leite, G. W., Pulcinelli, S. H., & Santilli, C. V. (2021). Zeta potential and colloidal stability predictions for inorganic nanoparticle dispersions: Effects of experimental conditions and electrokinetic models on the interpretation of results. *Langmuir*, 37(45), 13379-13389.
42. Raguindin, R. K. M., & Mercado, C. C. (2023). Localized surface plasmon resonance shift of biosynthesized and functionalized quasi-spherical gold nanoparticle systems. *RSC advances*, 13(35), 24211-24227.
43. Rolo, M., González-Blanco, B., Reyes, C. A., Rosillo, N., & López-Roa, P. (2023). Epidemiology and factors associated with extra-pulmonary tuberculosis in a low-prevalence area. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, 32, 100377.
44. Saravanakumar, K., Mariadoss, A. V. A., Sathiyaseelan, A., & Wang, M. H. (2020). Synthesis and characterization of nano-chitosan capped gold nanoparticles with multifunctional bioactive properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 747-757.

45. Seid, G., Alemu, A., Tsedalu, T., & Dagne, B. (2022). Value of urine-based lipoarabinomannan (LAM) antigen tests for diagnosing tuberculosis in children: systematic review and meta-analysis. *IJID regions*, 4, 97-104.
46. Sosa, A. R. T., del Villar Pérez, V. M., Serrano, A. B., Pando, R. H., Valdez, J. Á. O., & Melgarejo, T. (2012). Evaluation of the K9CATH peptide in the treatment of experimental pulmonary tuberculosis. *African Journal of Microbiology Research*, 6(38), 6726-6729.
47. Srijampa, S., Buddhisa, S., Ngermpimai, S., Leelayuwat, C., Proungvitaya, S., Chompoosor, A., & Tippayawat, P. (2020). Influence of gold nanoparticles with different surface charges on localization and monocyte behavior. *Bioconjugate Chemistry*, 31(4), 1133-1143.
48. Uboldi, C., Bonacchi, D., Lorenzi, G., Hermanns, MI, Pohl, C., Baldi, G., ... y Kirkpatrick, CJ (2009). Las nanopartículas de oro inducen citotoxicidad en las líneas celulares alveolares de tipo II A549 y NCIH441. *Toxicología de partículas y fibras*, 6, 1-12.
49. Vandamme, D., Landuyt, B., Luyten, W., & Schoofs, L. (2012). A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cellular immunology*, 280(1), 22-35.
50. Vázquez-Guevara, J. D., & Moreno, K. O. J. (2022). Importancia del tamaño del diámetro de nanopartículas de óxidos metálicos en respuestas celulares de adipocitos. *Revista de Farmacología*, 1(1), 18-29.
51. Velayati, A. A., & Farnia, P. (2012). *Morphological characterization of Mycobacterium tuberculosis* (pp. 978-953). ISBN.
52. Velayati, A. A., & Farnia, P. (2016). *Atlas of Mycobacterium tuberculosis*. Academic Press.
53. Wang, X., Zhang, J., Wu, Y., Xu, Y., & Zheng, J. (2023). SIgA in various pulmonary diseases. *European Journal of Medical Research*, 28(1), 299.
54. Zhai, W., Wu, F., Zhang, Y., Fu, Y., & Liu, Z. (2019). The immune escape mechanisms of Mycobacterium tuberculosis. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 340.

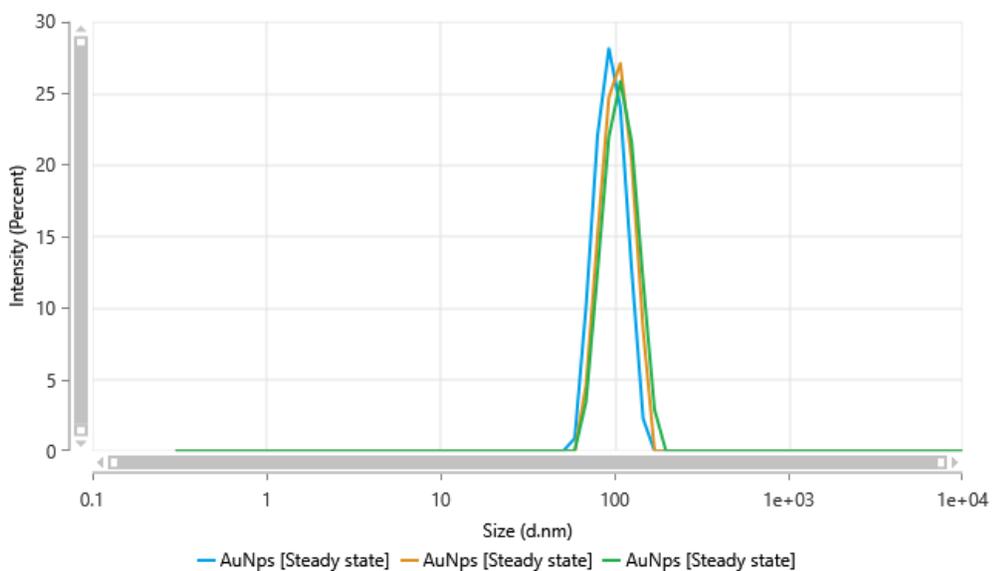
13. ANEXOS

ANEXO 1

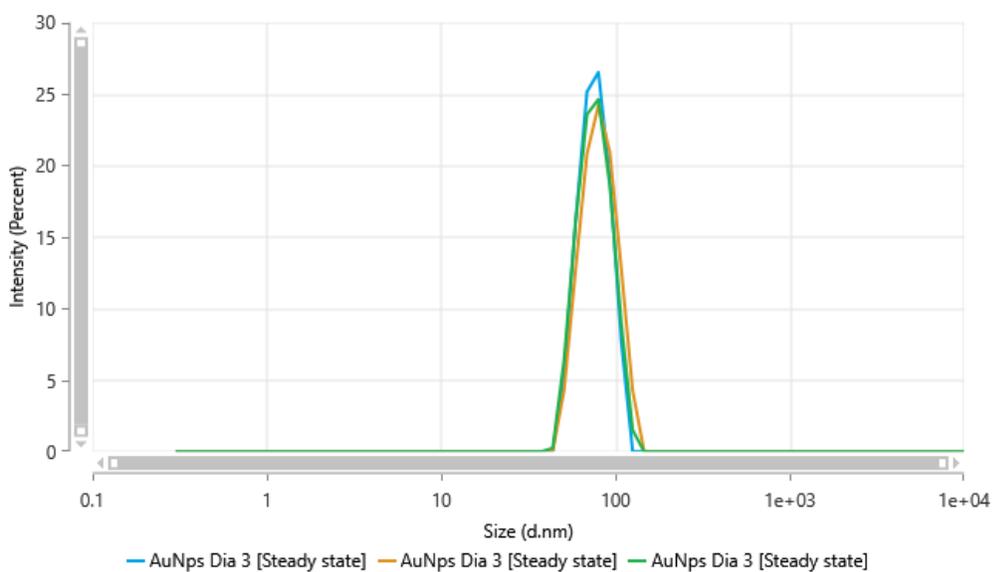
DLS AuNps

Tamaño

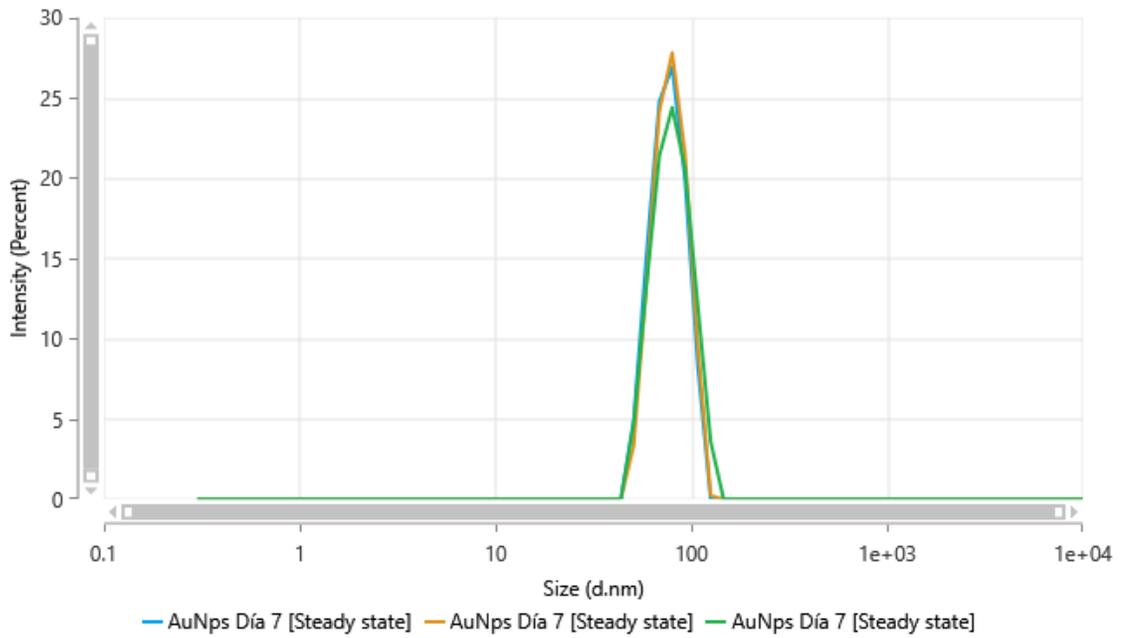
Día 1



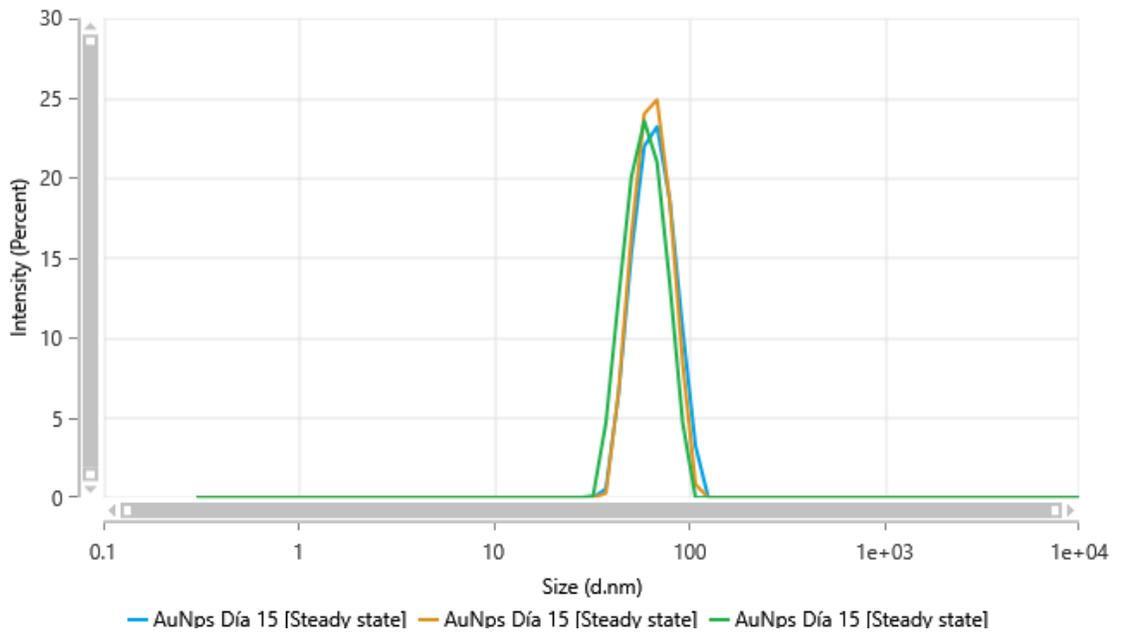
Día 3



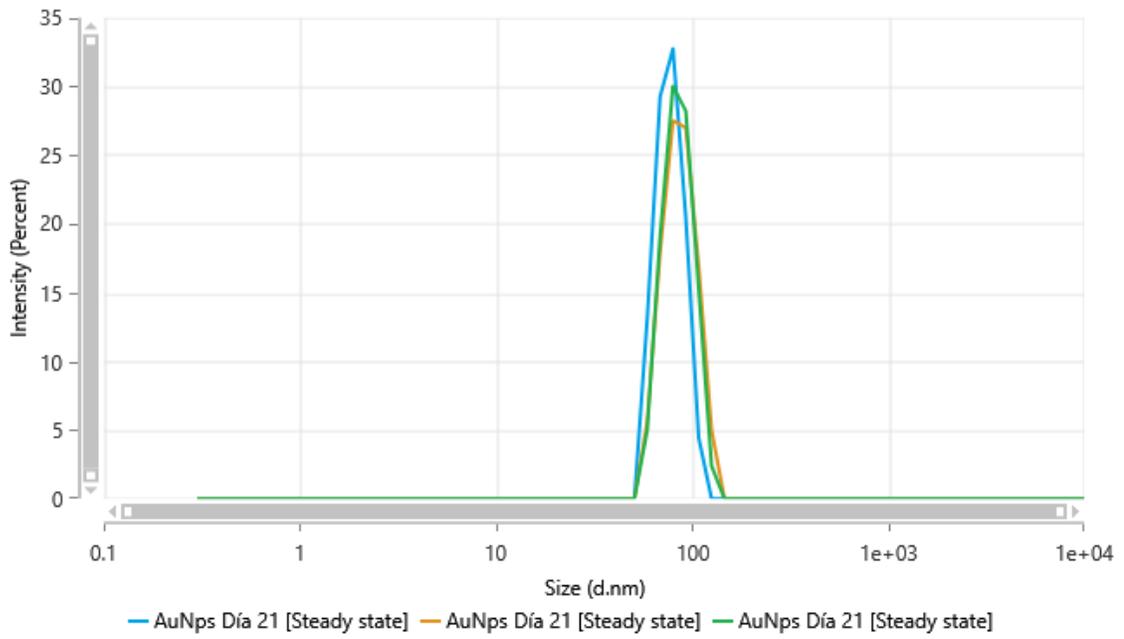
Día 7



Día 15

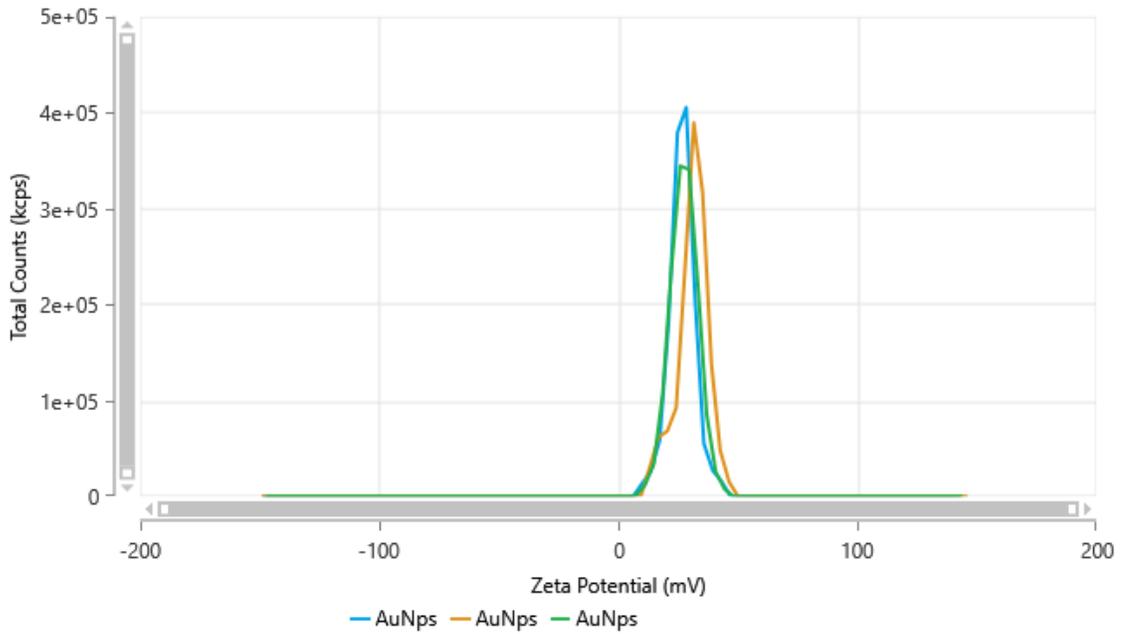


Día 21

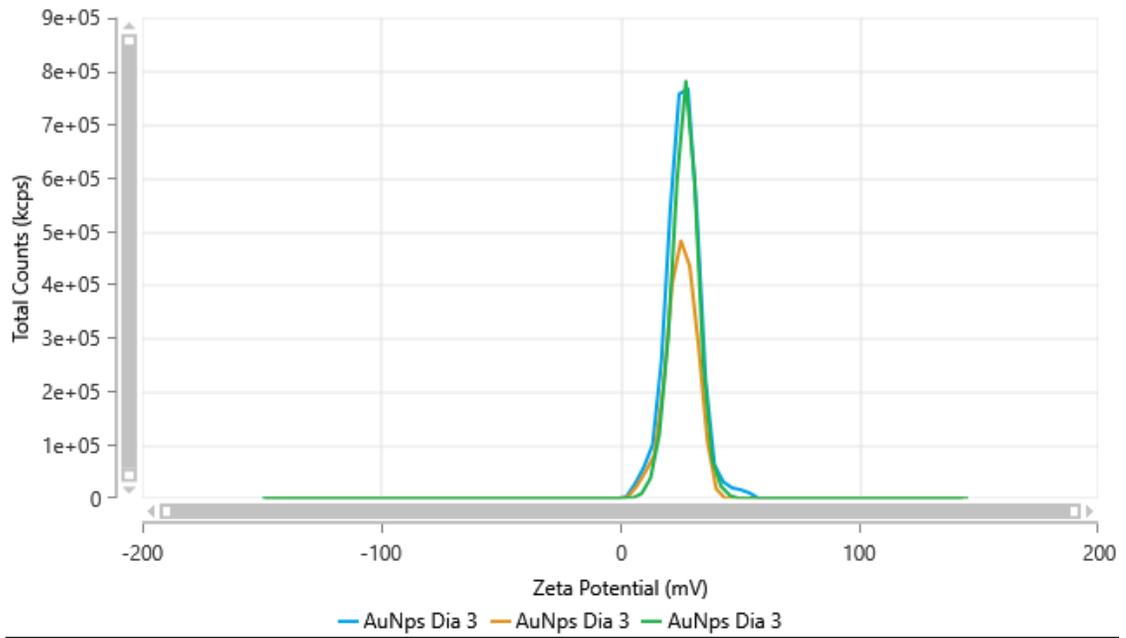


Potencial Z

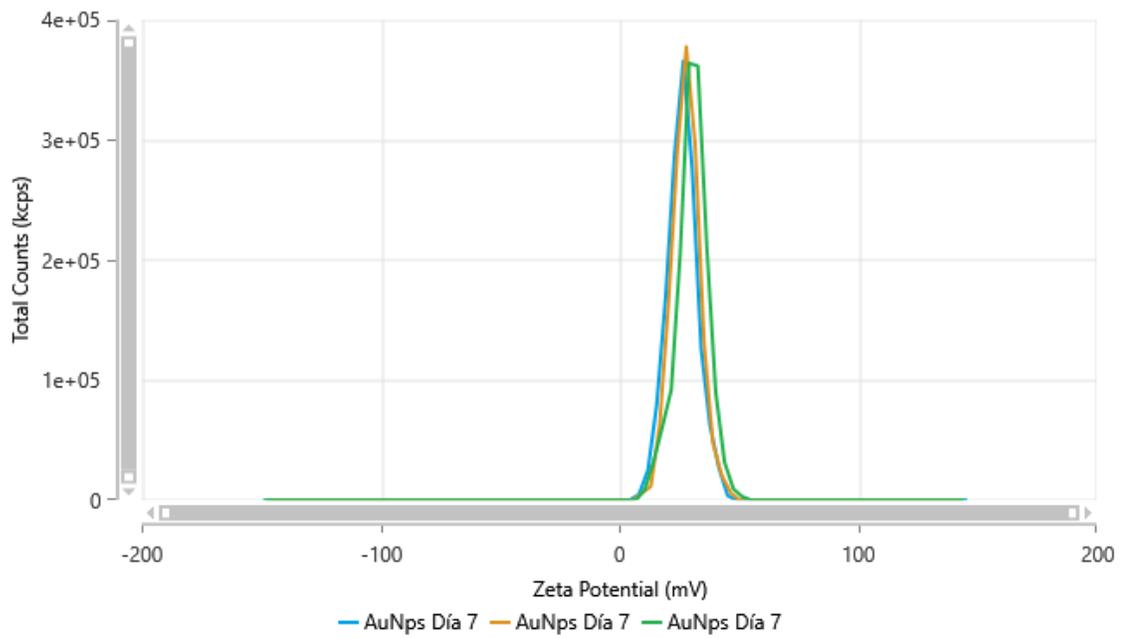
Día 1



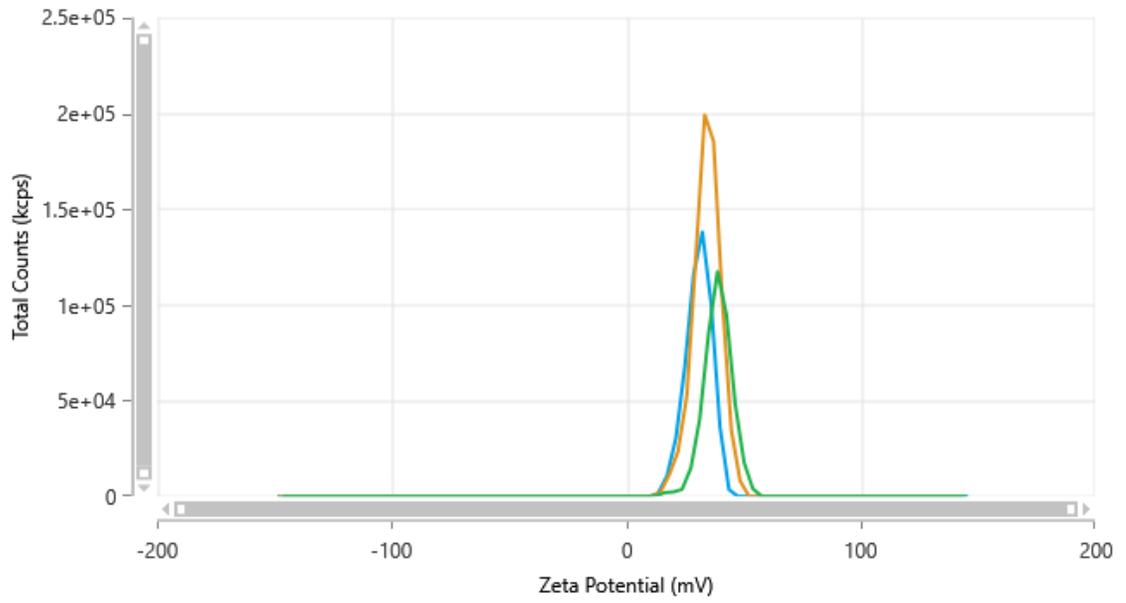
Día 3



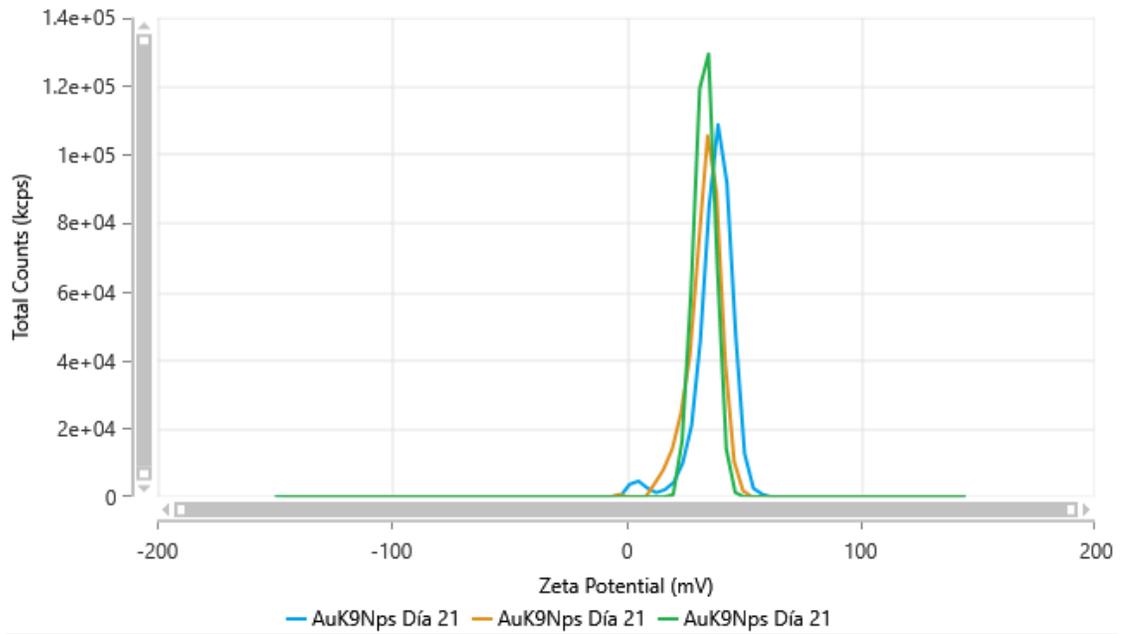
Día 7



Día 15



Día 21

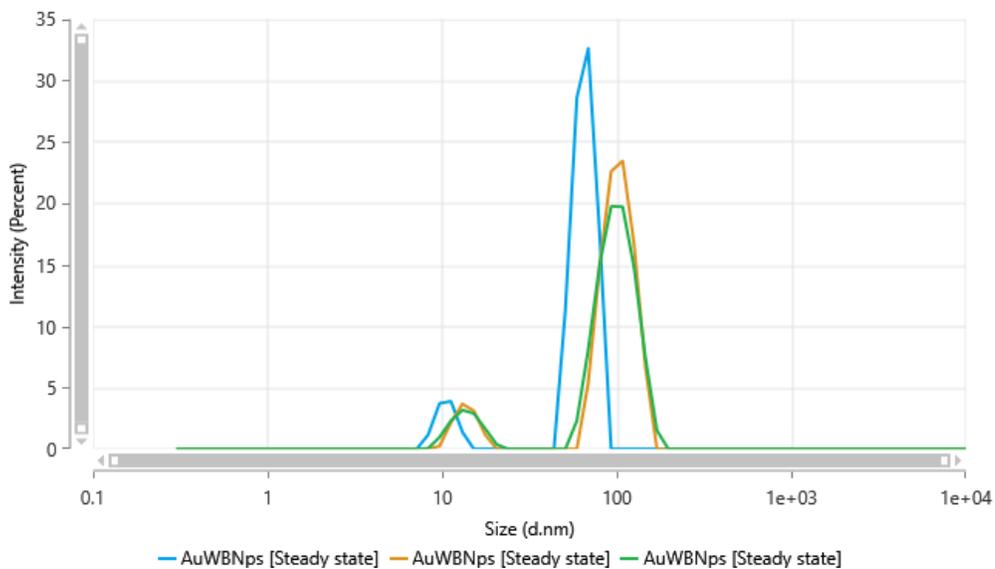


ANEXO 2

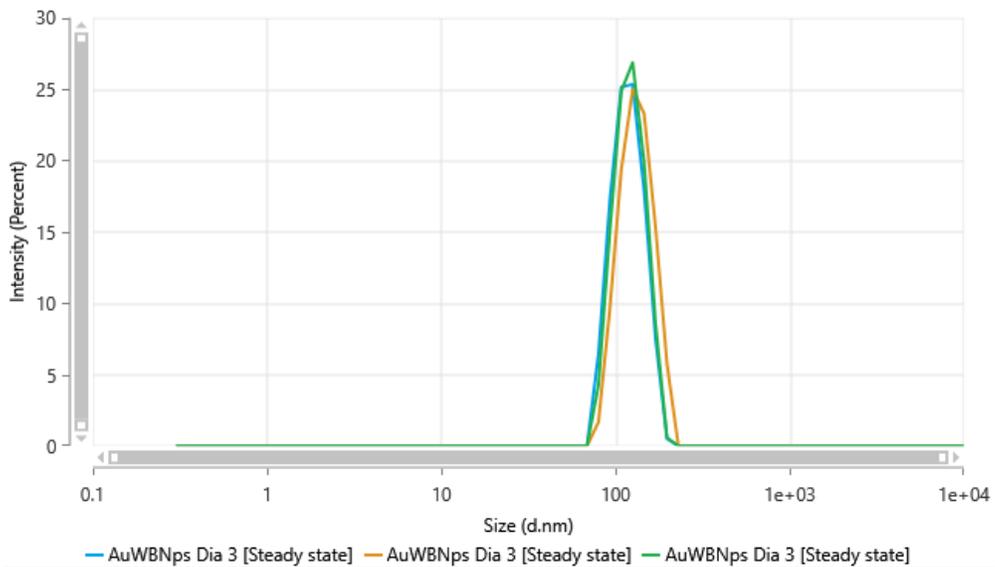
DLS AuWBNps

Tamaño

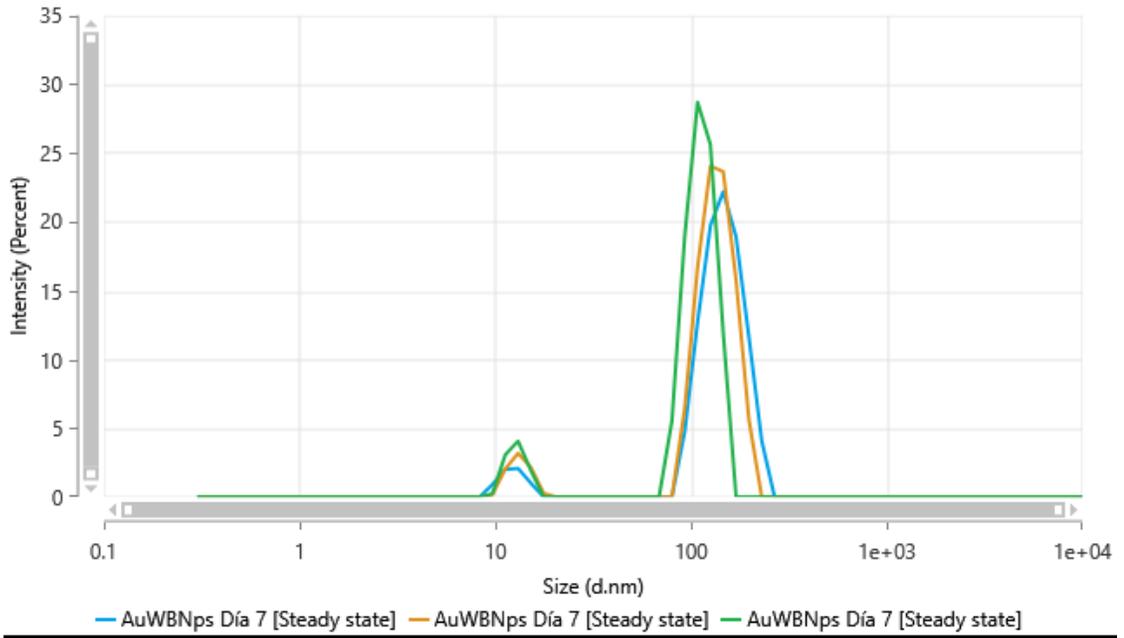
Día 1



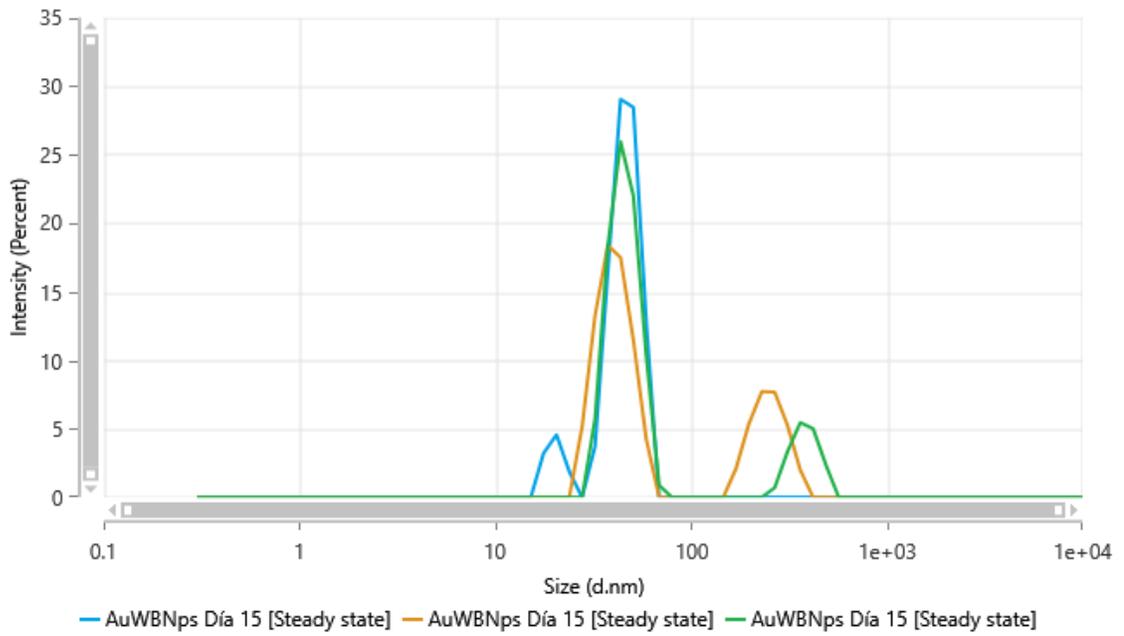
Día 3



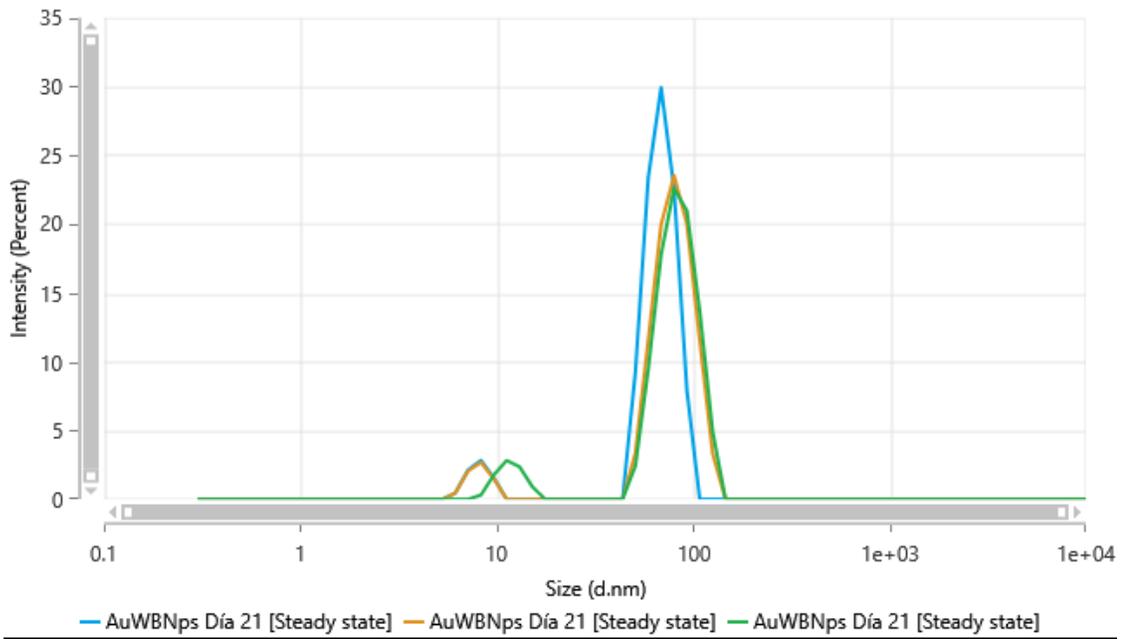
Día 7



Día 15

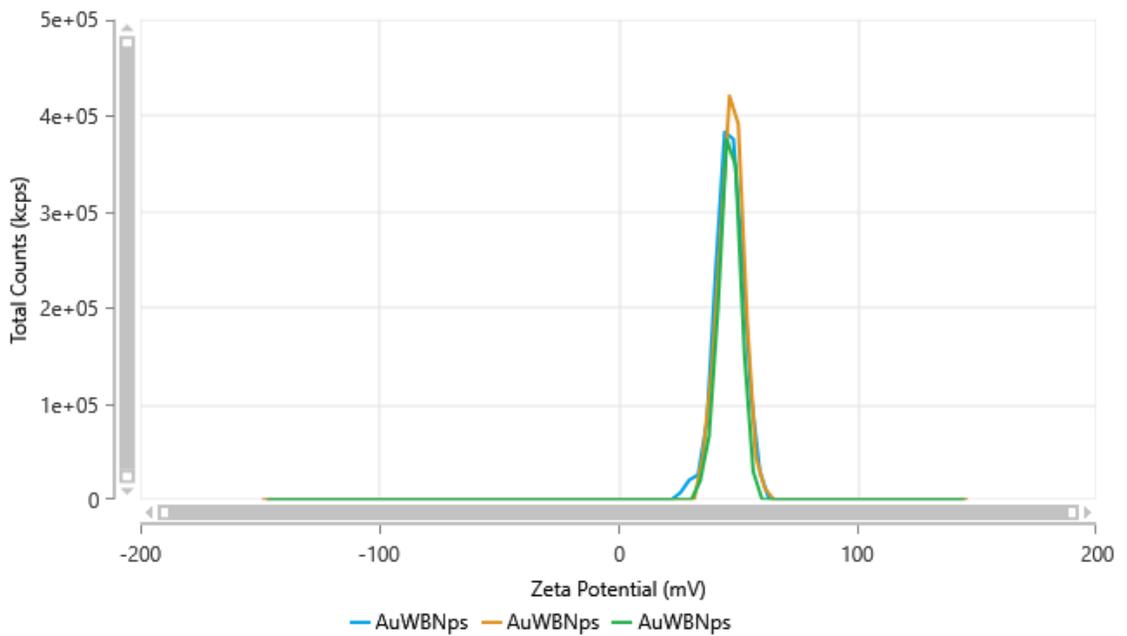


Día 21

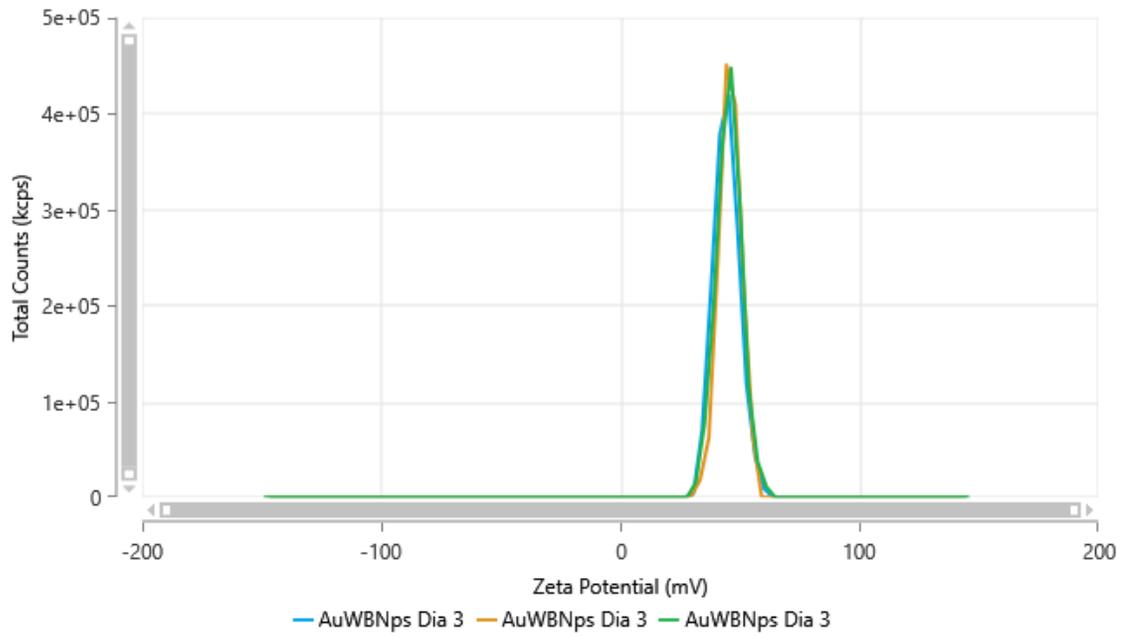


Potencial Z

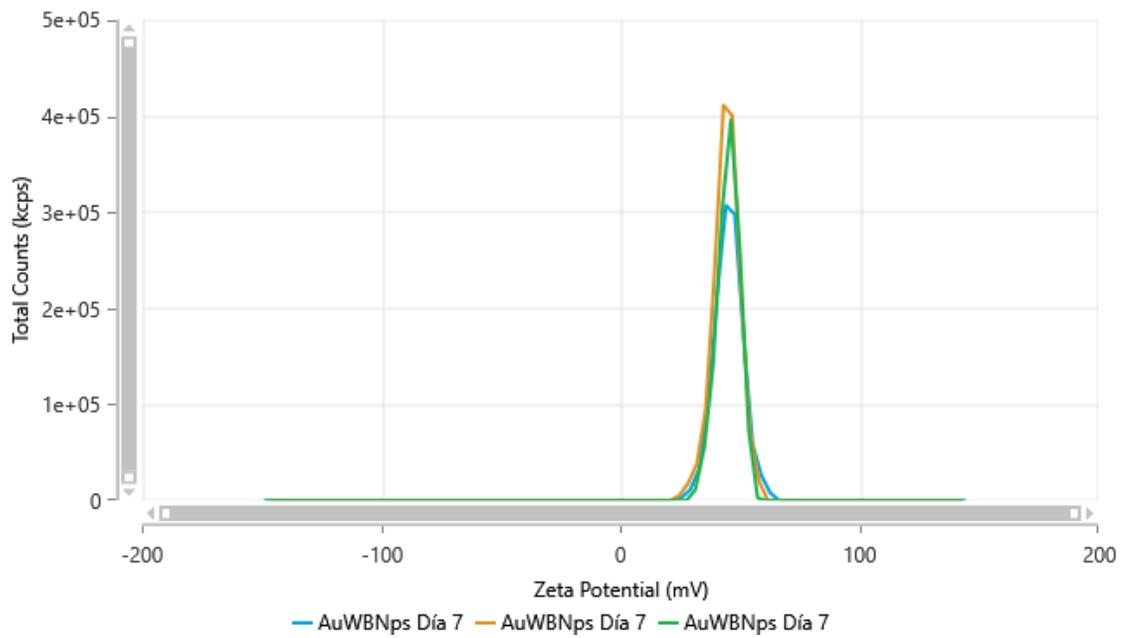
Día 1



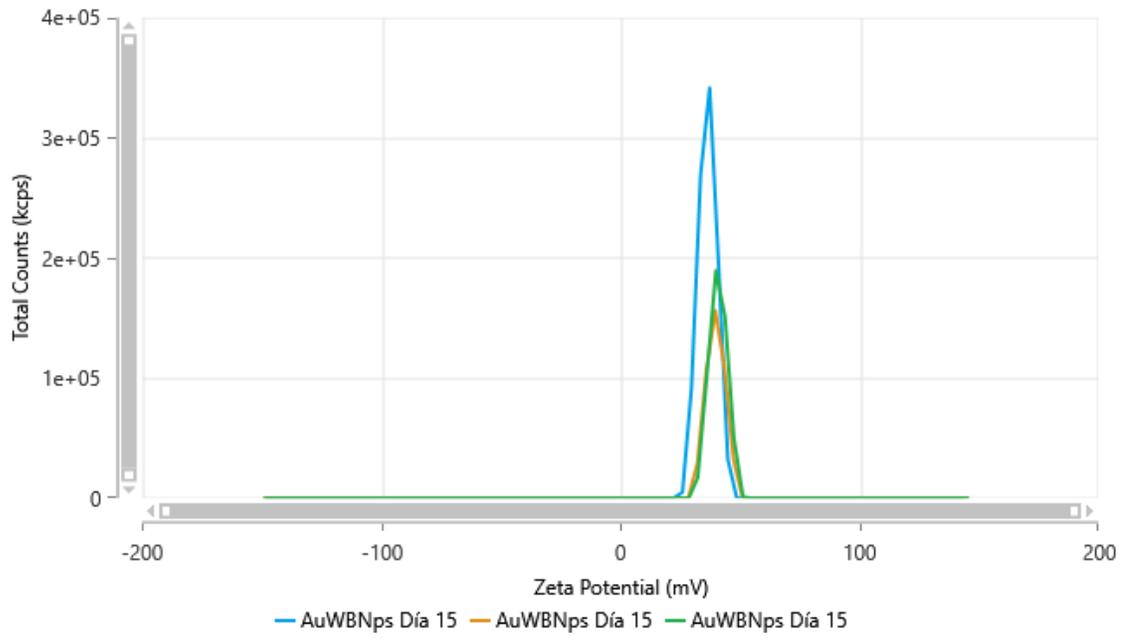
Día 3



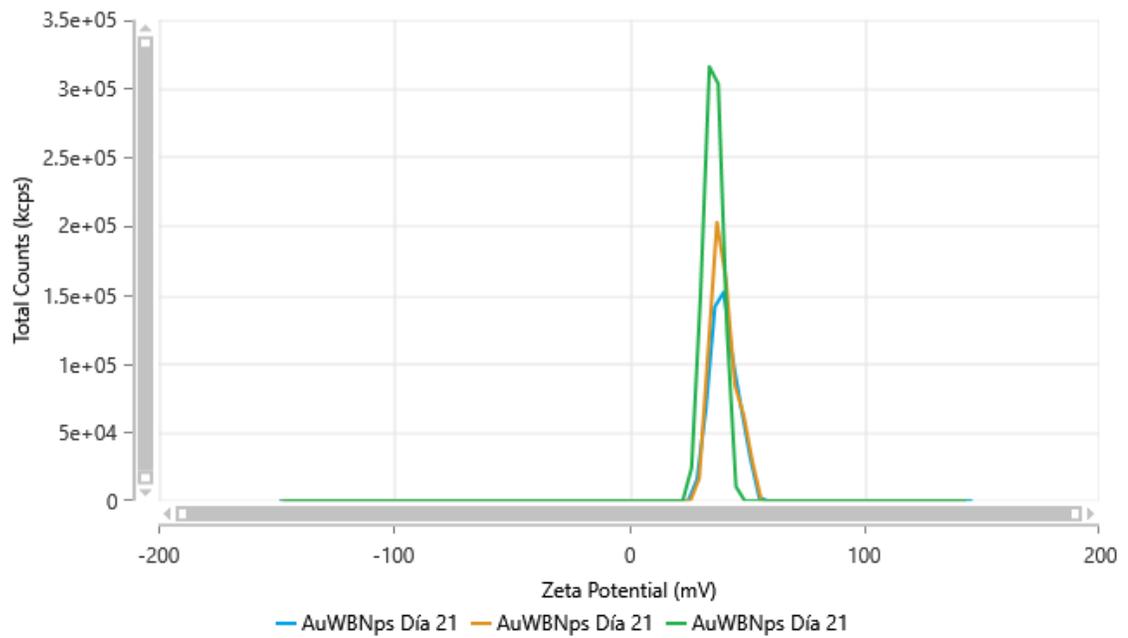
Día 7



Día 15



Día 21

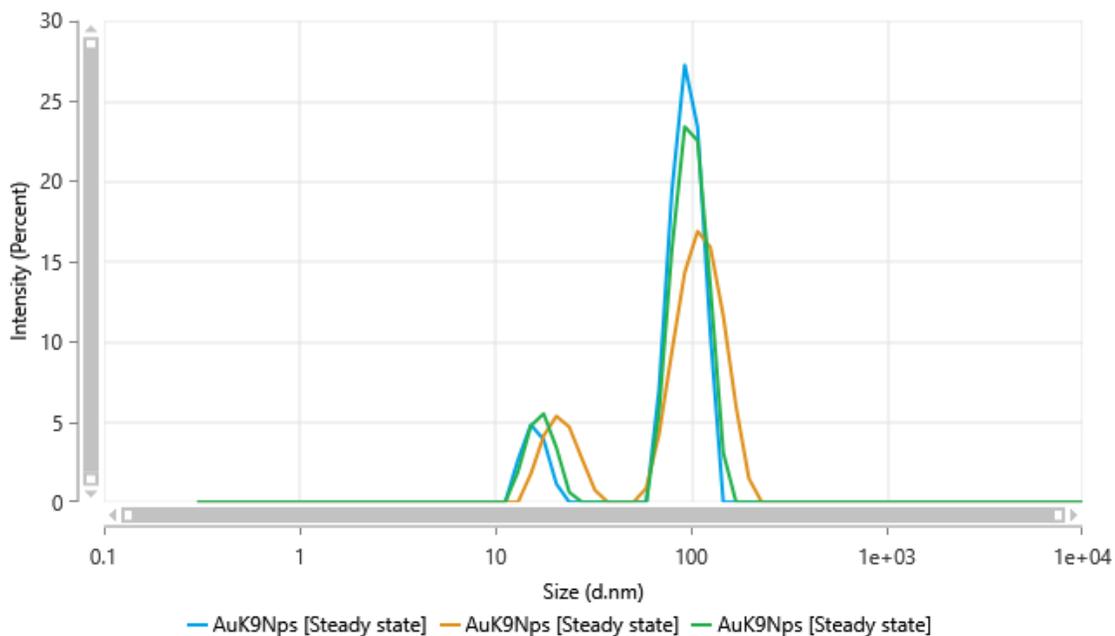


ANEXO 3

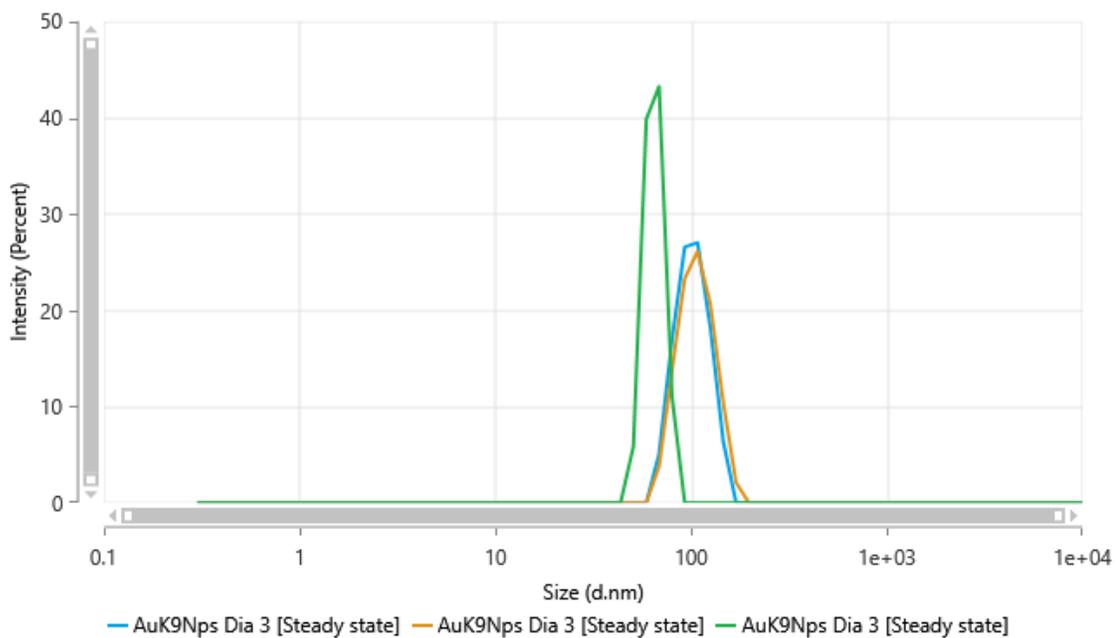
DLS AuK9Nps

Tamaño

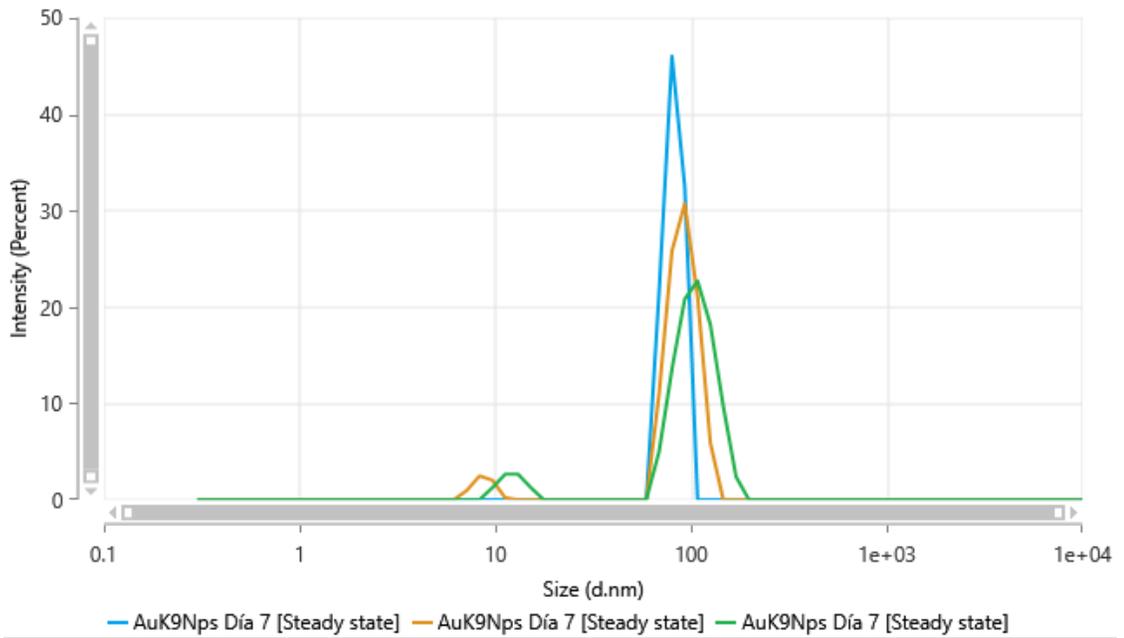
Día 1



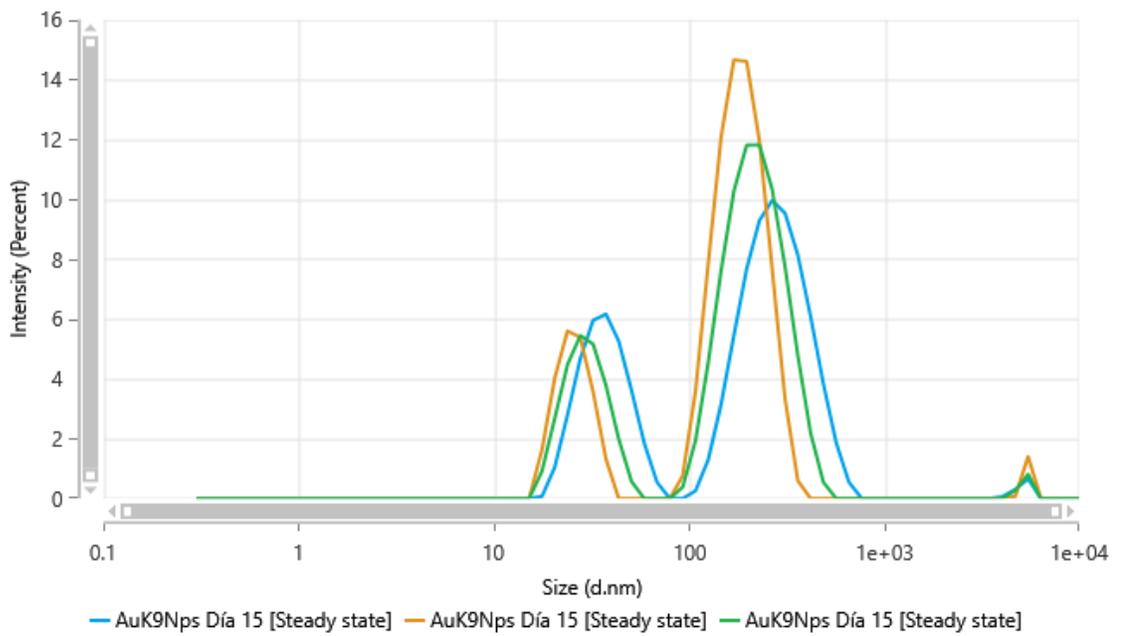
Día 3



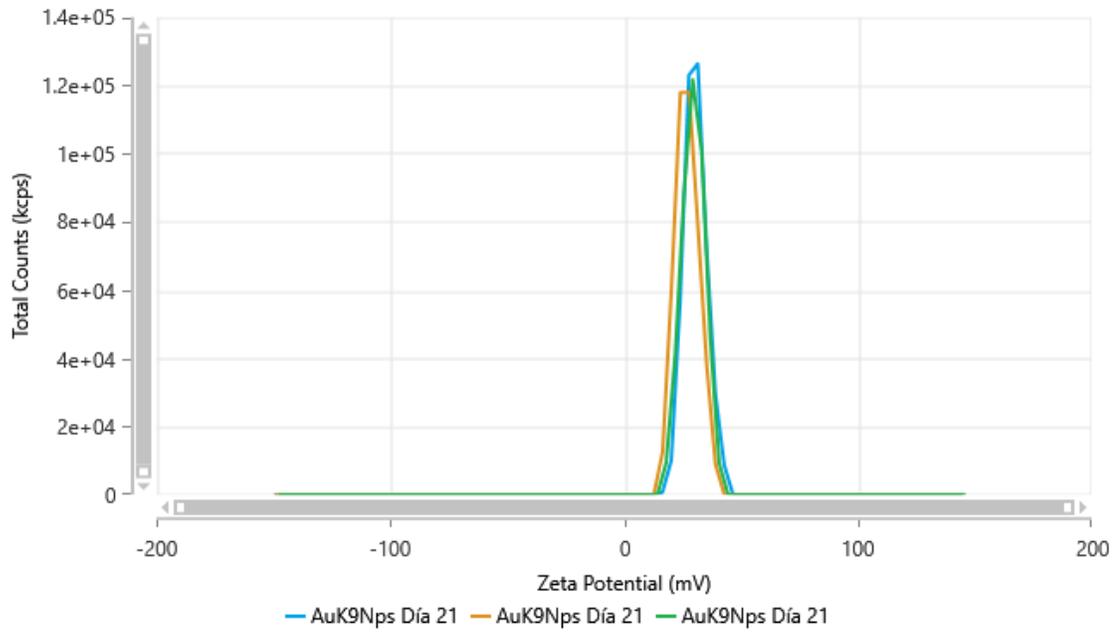
Día 7



Día 15

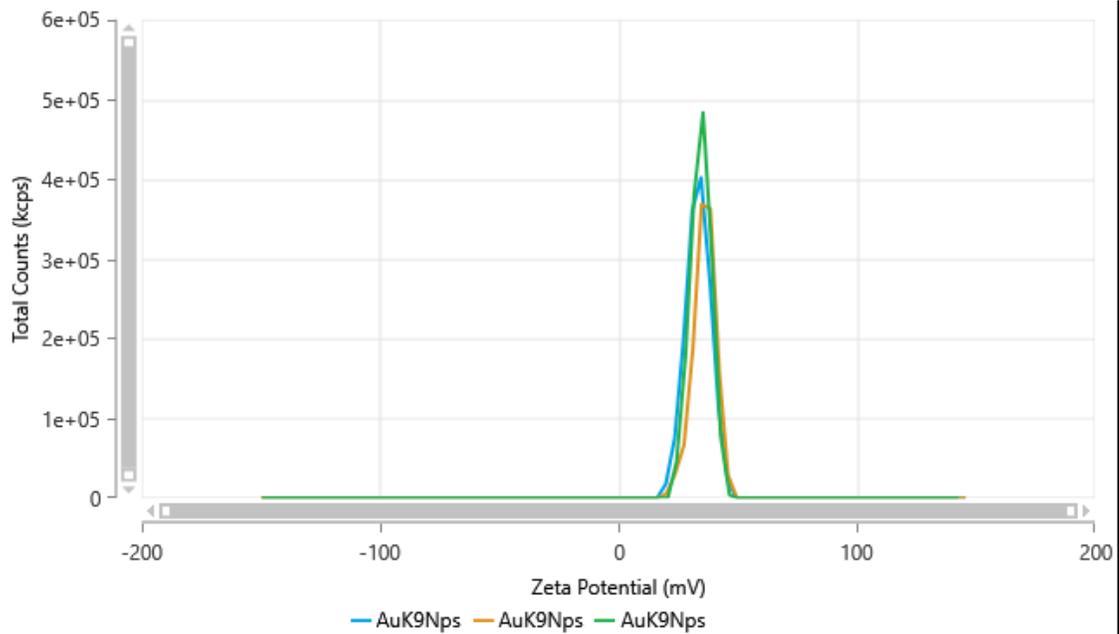


Día 21

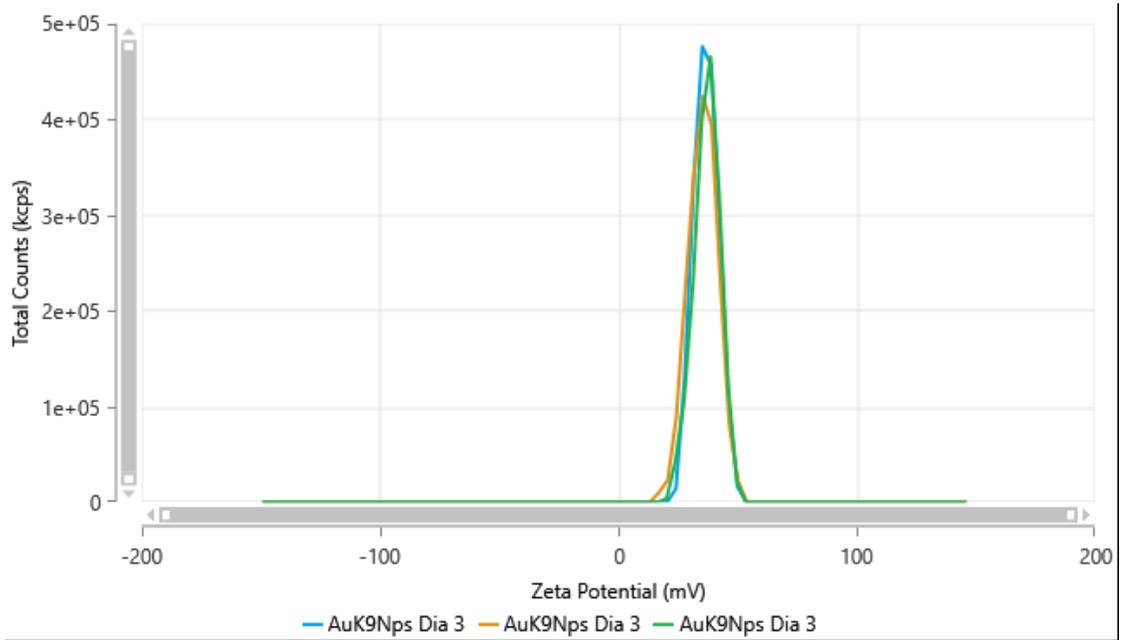


Potencial Z

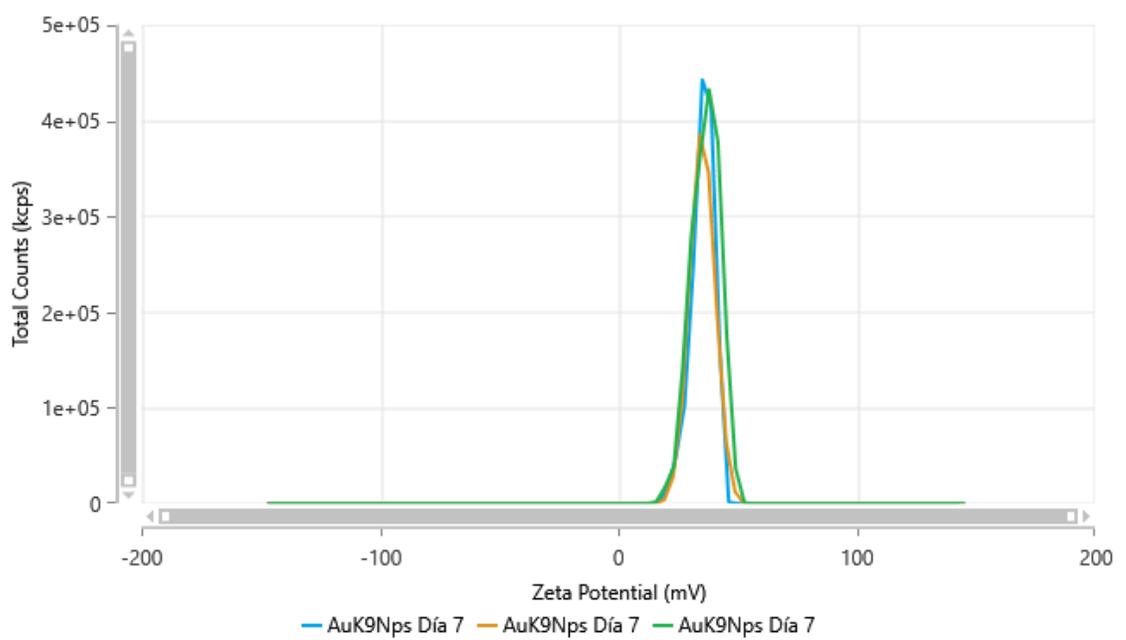
Día 1



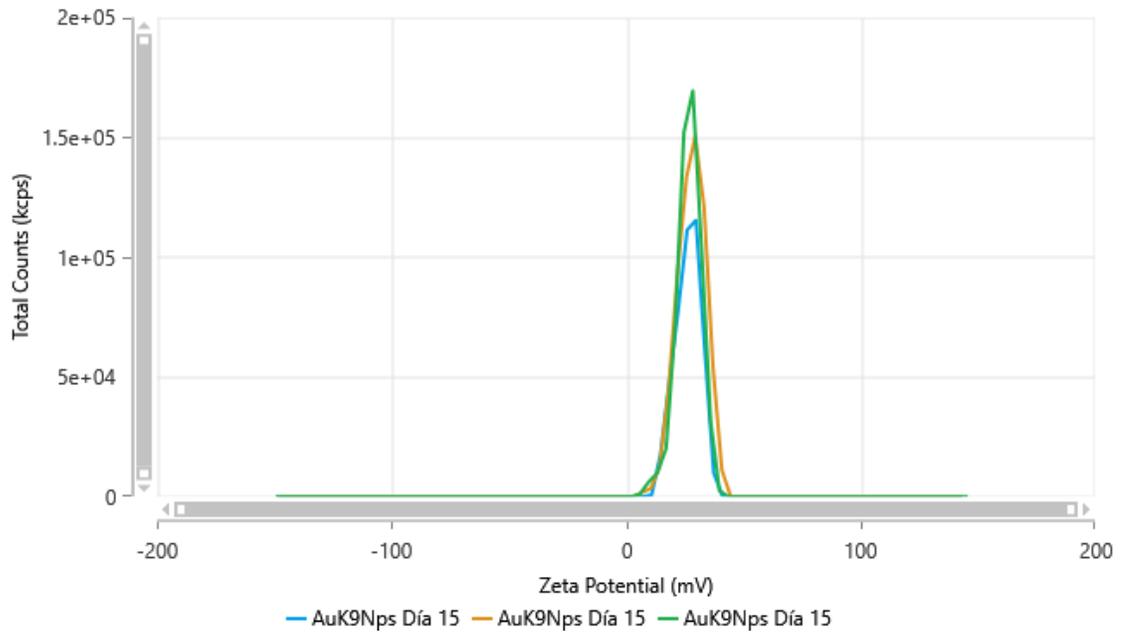
Día 3



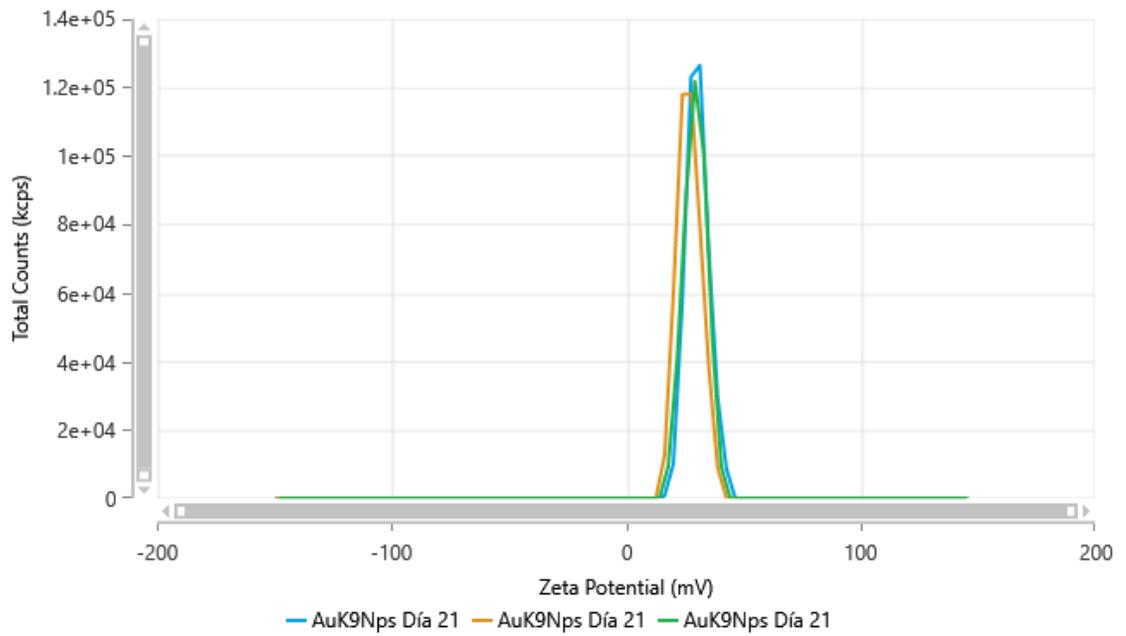
Día 7



Día 15



Día 21



ANEXO 4

Curva Estándar de BD OpteEIA™ Mouse TNF ELISA Kit

