

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DEL EFECTO INMUNOMODULADOR Y MICROBICIDA
DE LOS PÉPTIDOS DMS-DA6 y DRS-DA2N EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE ACTINOMICETOMA POR *N. brasiliensis*.**

POR

M. C. DIANA IVONNE DUARTE MATA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGÍA**

JULIO 2025

**ANÁLISIS DEL EFECTO INMUNOMODULADOR Y MICROBICIDA DE LOS PÉPTIDOS
DMS-DA6 y DRS-DA2N EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ACTINOMICETOMA
POR *N. brasiliensis*.**

Aprobación de la Tesis



Dr. C. Mario César Salinas Carmona
Director



Dra. C. Constance Auvynet
Co-director



Dr. C. Anna Velia Vázquez Marmolejo
Miembro de la Comisión



Dr. C. Adrián Geovanni Rosas Taraco
Miembro de la Comisión



Dr. C. Manuel Guadalupe Mejía Torres
Miembro de la Comisión



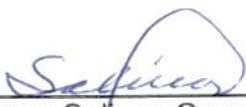
Dr. med Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

**ANÁLISIS DEL EFECTO INMUNOMODULADOR Y MICROBICIDA DE LOS
PÉPTIDOS DMS-DA6 y DRS-DA2N EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE
ACTINOMICETOMA POR *N. brasiliensis*.**

Presentado por: Diana Ivonne Duarte Mata

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

Autorizado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario "José Eleuterio González" con el número de registro: IN23-00007.



Dr. Mario Cesar Salinas Carmona
Director de Tesis



Dra. Constance Auvynet
Co-Directora de Tesis



Anna Velia Vázquez Marmolejo
Miembro de la Comisión



Dr. Adrián Geovanni Rosas Taraco
Miembro de la Comisión



Dr. Manuel Guadalupe Mejía Torres
Miembro de la Comisión

Dedicatoria

A mi pequeña Elisa, que siempre ha sido una inspiración para mí y que, a pesar de ser tan pequeña, me da las fuerzas que necesito para siempre ser mejor.

A mi Damián, por hacerme más fuerte y valiente, y por enseñarme nuevas formas de ver la vida.

A mi esposo Jaudiel, que es un soporte fundamental en mi vida, y que siempre me ha brindado de su apoyo y amor para superarme en la vida.

Agradecimientos

Agradezco a mi familia, mi papá Juan Carlos, mi mamá Letty, mis hermanas Karla y Karol por siempre brindarme su apoyo y cariño incondicional. Por siempre alentarme en mis proyectos y por estar presentes en los momentos más importantes de mi vida.

Agradezco al Dr. Mario César Salinas Carmona por brindarme la oportunidad de crecer en conocimiento bajo su tutela, por sus consejos y disposición a lo largo del doctorado, y por la confianza brindada en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Constance Auvynet por brindarme de su apoyo y de su tiempo desde la concepción de este trabajo hasta la finalización de él.

A la Dra. Velia Vázquez que me acompañó desde principio a fin en todo el transcurso del proyecto, por sus consejos y paciencia durante mi estancia como alumna.

Al Dr. Adrián Rosas y Dr. Manuel Mejia por su disposición y ayuda a lo largo de este proyecto de tesis. Así como a todos los doctores pertenecientes al departamento de Inmunología: Dra. Nallely, Dra. Angeles, Dra. Yolanda, Dr. Medina, Dr. Noe por todos sus conocimientos compartidos y por apoyarme en mi formación como científica.

A mis compañeras de generación Kenia y Raquel por la amistad brindada y por los bonitos y alegres momentos que compartimos durante estos cuatro años.

A los becarios Estefania Sosa y Antonio Jimenez por su disposición para brindarme ayuda en el proyecto.

A todo el personal que conforma el Departamento de Inmunología por el tiempo compartido y por la ayuda brindada durante mi estancia en el departamento.

Indice general

CAPÍTULO 1.....	11
Introducción	11
1.1 El micetoma y su patogénesis	11
1.2 Clasificación del género <i>Nocardia</i>	12
1.3 El modelo experimental de actinomicetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i>	13
1.4 Histopatología del Micetoma	13
2.1 Inmunidad Celular en la Infección por <i>Nocardia spp</i>	15
3.1 Tratamientos convencionales para el actinomicetoma.....	16
3.2 Terapias alternativas para el actinomicetoma.....	17
3.3 Péptidos antimicrobianos como alternativa terapéutica	17
3.4 Péptidos antimicrobianos y su capacidad para modular la respuesta inmune.....	19
3.4.1 La respuesta inmune innata modificada por AMPs	20
3.4.2 La respuesta inmune adquirida modificada por AMPs	21
3.5 Los péptidos antimicrobianos DMS-DA6 y DRS-DA2N.....	22
CAPÍTULO 2.....	24
Justificación.....	24
CAPÍTULO 3.....	25
Hipótesis	25
CAPÍTULO 4.....	26
Objetivo general.....	26
CAPÍTULO 5.....	27
Objetivos específicos	27
CAPÍTULO 6.....	28
Materiales y Métodos.....	28
6.1. Purificación e identificación de péptidos mediante espectrometría de masas.	28
6.2 Síntesis de péptidos en fase sólida.	28
6.3 Actividad antibacteriana <i>in vitro</i>	29
6.4 Modelo murino de actinomicetoma.....	30
6.5 Tratamiento con los péptidos antimicrobianos DMS-DA6 y DRS-DA2N y el antibiótico Linezolid.....	30
6.6 Evaluación del tratamiento con péptidos antimicrobianos	32
6.6.1 Seguimiento Clínico	33
6.7 Procesamiento de tejidos	33

6.7.1 Obtención de sangre periférica venosa	33
6.7.2 Digestión del cojinete plantar	34
6.7.3 Digestión de bazo	34
6.8 Determinación de carga bacteriana en cojinete plantar infectado	35
6.9 Cuantificación de poblaciones celulares por citometría de flujo	35
6.10 Cuantificación de citocinas en suero	36
6.11 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	36
6.12 Análisis Estadístico	37
CAPÍTULO 7	38
Resultados	38
7.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Bactericida (MBC) <i>in vitro</i> de los péptidos antimicrobianos contra <i>N. brasiliensis</i>	38
7.2 Determinación de la eficacia del tratamiento con péptidos antimicrobianos contra <i>N.</i> <i>brasiliensis in vivo</i>	38
7.3 Identificación de los efectos inmunomoduladores de los péptidos antimicrobianos en la infección por <i>N. brasiliensis in vivo</i>	42
7.3.1 Identificación de los efectos inmunomoduladores de los péptidos antimicrobianos en la infección por <i>N. brasiliensis in vivo</i>	43
7.4 Identificación de los efectos inmunomoduladores de los péptidos antimicrobianos en cojinete plantar.	43
7.5 Identificación de los efectos inmunomoduladores de los péptidos antimicrobianos en bazo.	45
7.6 Identificación de los efectos inmunomoduladores de los péptidos antimicrobianos en sangre periférica venosa.	47
7.7 Identificación de los efectos inmunomoduladores de los péptidos antimicrobianos en citocinas presentes en suero.	49
CAPITULO 8.....	57
Discusión	57
CAPÍTULO 9.....	67
Conclusión	67
CAPÍTULO 10.....	68
Perspectivas	68
Bibliografía	69

Lista de Tablas

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales para citometría de flujo. Se especifican las características de los anticuerpos utilizados para el análisis por citometría de flujo.	36
Tabla 2. Concentración Mínima Inhibitoria (<i>MIC</i>) y Concentración Mínima Bactericida (<i>MBC</i>) de los péptidos antimicrobianos “DMS-DA6” y “DRS-DA2N”.	38

Lista de Figuras

Figura 1. Imágenes de microscopía de tejido infectado con <i>N. brasiliensis</i> .	14
Figura 2. Esquema de tratamientos con péptidos antimicrobianos y el antibiótico Linezolid.	31
Figura 3. Grafica de supervivencia de los ratones tratados con péptidos antimicrobianos y Linezolid.	39
Figura 4. Cambio de peso de los ratones durante la administración de los tratamientos con los péptidos antimicrobianos y Linezolid.	40
Figura 5. Cambio de volumen del cojinete plantar infectado de los ratones tratados con péptidos antimicrobianos y Linezolid.	41
Figura 6. Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (CFU) en cojinete plantar infectado.	42
Figura 7. Dot plots representativos de la citometría de flujo en cojinete plantar, bazo y sangre periférica venosa.	43
Figura 8. Porcentaje de Linfocitos T CD4+ y CD8+ en cojinete plantar.	44
Figura 9. Porcentaje de macrófagos y neutrófilos en cojinete plantar.	45
Figura 10. Porcentaje de Linfocitos T CD4+ y CD8+ en bazo	46
Figura 11. Porcentaje de macrófagos, monocitos y neutrófilos en bazo.	47
Figura 12. Porcentaje de Linfocitos T CD4+ y CD8+ en sangre periférica venosa.	48
Figura 13. Porcentaje de monocitos y neutrófilos en sangre periférica venosa.	49
Figura 14. Niveles séricos de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 α , IL-1 β e IL-6.	50
Figura 15. Niveles séricos de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-12p70.	52
Figura 16. Niveles séricos de las citocinas pro-inflamatorias IFN- β e IL-27.	53
Figura 17. Niveles séricos de las citocinas pro-inflamatorias IFN- γ , IL-23 e IL-17A.	54
Figura 18. Niveles séricos de las quimiocinas MCP-1 y GM-CSF.	55
Figura 19. Nivel sérico de la citocina anti-inflamatoria IL-10.	56

Resumen

M.C. Diana Ivonne Duarte Mata

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título del trabajo: Análisis del efecto inmunomodulador y microbicida de los péptidos DMS-DA6 y DRS-DA2N en un modelo experimental de actinomicetoma por *N. brasiliensis*.

Número de páginas: 82

Propósito y método: El actinomicetoma es una enfermedad tropical desatendida reconocida por la Organización Mundial de la Salud. En América, su principal agente etiológico es la bacteria Gram-positiva *Nocardia brasiliensis*. Los tratamientos actuales son prolongados, costosos, tóxicos y se han descrito casos de resistencia antibiótica. Los péptidos antimicrobianos, por sus propiedades bactericidas e inmunomoduladoras, representan una alternativa terapéutica prometedora. Los péptidos DMS-DA6 y DRS-DA2N, aislados de la rana mexicana *Pachymedusa dacnicolor*, presentan una potente actividad *in vitro* frente a bacterias Gram-positivas; además, DRS-DA2N posee actividad inmunomoduladora. Sin embargo, su eficacia *in vivo* no había sido evaluada. En este estudio analizamos el efecto terapéutico de ambos péptidos en un modelo murino BALB/c de actinomicetoma por *N. brasiliensis*. Los animales infectados recibieron tratamiento durante tres semanas mediante inyección intramuscular y los resultados se compararon con el antibiótico linezolid. **Contribuciones y conclusiones:** DMS-DA6 y DRS-DA2N mostraron mayor eficacia terapéutica que linezolid, al reducir significativamente la inflamación del cojín plantar y la carga bacteriana utilizando dosis menores y un menor número de aplicaciones. Asimismo, ambos tratamientos modificaron de forma significativa las poblaciones de leucocitos tanto en el tejido infectado como a nivel sistémico, con cambios en monocitos, neutrófilos y linfocitos T CD4+ y CD8+. También alteraron las concentraciones plasmáticas de IFN- γ , IL-23 e IL-10. En conjunto, estos resultados respaldan el potencial de DMS-DA6 y DRS-DA2N como una alternativa terapéutica innovadora para el tratamiento del actinomicetoma.



Director de Tesis
Dr. C. Mario Cesar Salinas Carmona

CAPÍTULO 1

Introducción

1.1 El micetoma y su patogénesis

El Micetoma es una enfermedad granulomatosa crónica subcutánea, de carácter inflamatorio y de desarrollo lento, progresivo, deformante y destructivo. Recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido que el micetoma es una “enfermedad tropical desatendida” ya que la enfermedad no ha recibido mucha atención a pesar de la gran carga médica y financiera (1).

Esta es una infección crónica causada por microorganismos exógenos, que pueden ser hongos (eumicetoma) o bacterias del orden *Actinomycetales* (actinomicetoma). La infección se adquiere cuando estos microorganismos penetran la piel y el tejido subcutáneo a través de traumatismos menores, como pinchazos con espinas, astillas u otros objetos contaminados (2).

La enfermedad suele iniciar con la formación de un nódulo o tumefacción firme en el sitio de inoculación. Conforme progresa, se desarrollan microabscesos que drenan un exudado purulento a través de múltiples fístulas cutáneas. Este exudado contiene gránulos constituidos por agregados de filamentos del microorganismo, los cuales representan el foco de la respuesta inflamatoria (3). A pesar de su evolución crónica, el micetoma generalmente cursa sin dolor ni manifestaciones sistémicas. No obstante, cuando compromete estructuras como el tórax, la cabeza, el cuello o la columna vertebral, pueden presentarse síntomas respiratorios, neurológicos u otras complicaciones. En fases avanzadas, la infección ocasiona destrucción progresiva de los tejidos, deformidad y pérdida funcional de la región afectada (4).

A nivel mundial, aproximadamente el 60 % de los casos de micetoma son causados por actinomicetos y el resto por hongos. Entre los principales agentes etiológicos del actinomicetoma se encuentran especies de los géneros *Nocardia*, *Streptomyces* y *Actinomadura* (5). En comparación con el eumicetoma, el actinomicetoma presenta una evolución más agresiva, con mayor velocidad de diseminación y un

potencial destructivo más elevado (4). En México, esta forma de la enfermedad representa cerca del 97 % de los casos, siendo *Nocardia brasiliensis* el agente etiológico predominante, responsable de aproximadamente el 65 % de las infecciones (6).

1.2 Clasificación del género *Nocardia*

El Genero *Nocardia* es un grupo de bacterias de la Familia Nocardiaceae que pertenece al Orden de los Actinomycetales. Las bacterias de este grupo se caracterizan por formar filamentos ramificados constituidos por bacilos de aproximadamente 0.5 a 1 µm de diámetro, no presentan capsulas y tienen resistencia a la lisozima (7).

Las bacterias del género *Nocardia* crecen de forma aerobia a 37 °C en medios de cultivo convencionales, como el agar Sabouraud. La morfología de sus colonias varía entre especies; sin embargo, tras sucesivos subcultivos, las cepas suelen perder parte de sus características tintoriales y morfológicas originales. En estas condiciones, es frecuente la formación de colonias blancas, secas y fuertemente adheridas al agar, aunque también pueden presentar una apariencia pastosa o rugosa, tonalidades marrón salmón y un olor característico similar al de la tierra húmeda (8).

Las especies de *Nocardia* son bacterias Gram positivas y aerobias que, durante las etapas iniciales de crecimiento, desarrollan estructuras filamentosas ramificadas. Con el tiempo, estos filamentos pueden fragmentarse y dar lugar a formas cocoides o cocobacilares (9).

Entre las especies de este género, *Nocardia brasiliensis* constituye el principal agente etiológico del actinomicetoma en México. Se trata de una bacteria Gram positiva cuya pared celular contiene una elevada proporción de ácidos micólicos, compuestos que favorecen su supervivencia y contribuyen a su virulencia cuando este microorganismo saprófito invade los tejidos tras una inoculación traumática. Asimismo, la producción de enzimas antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa, le permite neutralizar las especies reactivas de oxígeno generadas

durante el estallido respiratorio de los fagocitos, facilitando su persistencia en el hospedero (7,9).

1.3 El modelo experimental de actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*

En 1999, Salinas-Carmona y colaboradores desarrollaron un modelo murino de actinomicetoma inducido por *Nocardia brasiliensis* mediante la inoculación del microorganismo en el cojín plantar de ratones BALB/c. Este modelo reproduce de manera consistente la evolución clínica de la enfermedad observada en humanos y ha sido ampliamente utilizado para estudiar la patogénesis del actinomicetoma y evaluar nuevas estrategias terapéuticas.

Tras la inoculación, se desencadena una respuesta inflamatoria aguda en el sitio de infección que alcanza su máxima intensidad aproximadamente a los siete días y disminuye gradualmente hasta resolverse alrededor del día 15. Posteriormente, a partir del día 30, la inflamación reaparece y aumenta progresivamente, lo que marca el establecimiento de la fase crónica de la infección. Conforme avanza la enfermedad, la lesión incrementa de tamaño y se acompaña de destrucción tisular, deformidad del cojín plantar, formación de abscesos y fístulas, así como drenaje de exudado con microcolonias bacterianas o gránulos.

Con base en esta evolución, la infección se divide en dos etapas: una fase aguda, comprendida entre los días 1 y 15 posteriores a la inoculación, y una fase crónica, que inicia a partir del día 30. La gravedad de las lesiones se evalúa de acuerdo con parámetros clínicos como el tamaño de la lesión, la presencia de úlceras, abscesos, fístulas y la expulsión de gránulos característicos del agente etiológico (10).

1.4 Histopatología del Micetoma

Las lesiones de actinomicetoma causadas por *Nocardia brasiliensis* en el modelo murino presentan características clínicas e histopatológicas muy similares a las observadas en pacientes, lo que respalda su utilidad para el estudio de esta enfermedad. Tras la inoculación del microorganismo en el cojín plantar de ratones, la inflamación aparece entre los días 3 y 5 y progresa hasta aproximadamente el

día 14. Posteriormente, la lesión permanece relativamente estable durante cerca de una semana. A partir del primer mes de infección, se observan abscesos visibles a través de la piel, algunos de los cuales se ulceran y drenan gránulos blanquecinos característicos del actinomicetoma (11).

Desde el punto de vista histopatológico, las lesiones se caracterizan por una respuesta inflamatoria granulomatosa con formación de abscesos que contienen gránulos bacterianos. Estos gránulos están constituidos por agregados de filamentos de *N. brasiliensis* inmersos en una matriz eosinófila conocida como cemento intercelular. En los primeros cuatro días de infección, el infiltrado inflamatorio está compuesto predominantemente por neutrófilos que rodean a las bacterias. Posteriormente, se desarrollan microabscesos en los que el cemento intercelular queda circundado por una capa de neutrófilos, seguida por linfocitos y macrófagos espumosos. Finalmente, el microabsceso es delimitado por una cápsula formada por fibroblastos, fibras de colágeno dispuestas de manera concéntrica y una capa periférica de mastocitos (12).

Aunque las manifestaciones clínicas del micetoma son similares independientemente del agente etiológico, las características histopatológicas de la lesión, así como el tamaño, la forma y el color de los gránulos, constituyen criterios útiles para orientar la identificación del microorganismo causante.

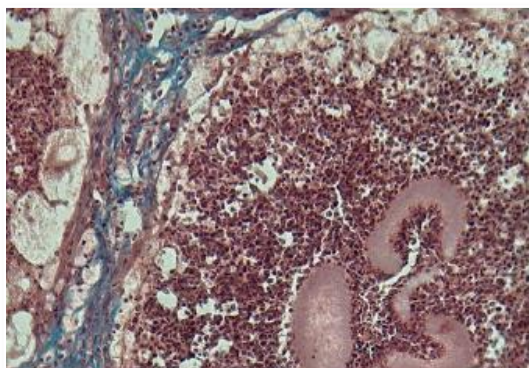


Figura 1. Imágenes de microscopía de tejido infectado con *N. brasiliensis*. Se muestran microabscesos rodeados de fibras de colágeno, en el centro una colonia de la bacteria causal (12).

2.1 Inmunidad Celular en la Infección por *Nocardia spp*

A diferencia de la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa se caracteriza por su alta especificidad frente a los antígenos, su capacidad de inducirse tras la exposición al patógeno, generar memoria inmunológica y ser transferible. Sus principales componentes son los linfocitos B y T, así como los productos secretados por estas células, entre ellos los anticuerpos (13).

La participación de los linfocitos en la respuesta inmunitaria frente a especies de *Nocardia* ha sido ampliamente estudiada en modelos experimentales. Ratones atímicos (*nude*), deficientes en linfocitos T, presentan una elevada susceptibilidad a la infección por *Nocardia asteroides* y desarrollan una infección sistémica letal, a diferencia de sus compañeros heterocigotos (*nude -/+*), que conservan parcialmente la función de estas células, generan una respuesta inflamatoria local frente a los antígenos de *Nocardia* y sobreviven a la infección (14). Hallazgos similares se han descrito en un modelo de infección por *N. brasiliensis* utilizando ratas atímicas, lo que confirma el papel esencial de los linfocitos T en la resistencia frente a este patógeno (15).

La protección mediada por los linfocitos T depende, en gran medida, de la activación de los macrófagos mediante citocinas, mecanismo fundamental para el control de patógenos intracelulares. Este tipo de respuesta inmunitaria también es indispensable para la eliminación de microorganismos como *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* (16). Además de su función reguladora, se ha demostrado que los linfocitos T obtenidos de animales previamente inmunizados pueden ejercer un efecto bactericida directo contra *N. asteroides*. Este mecanismo es específico del antígeno, requiere el contacto directo entre el linfocito y la bacteria y no afecta a microorganismos no relacionados.

Por otra parte, diversos estudios sugieren que una respuesta inmunitaria con predominio del perfil Th2 favorece la persistencia de la infección. En lesiones primarias y ganglios linfáticos drenantes de infecciones por *Streptomyces somaliensis* se ha observado un aumento en la producción de las citocinas IL-4 e

IL-10 (17). De manera similar, en el modelo murino de actinomicetoma por *N. brasiliensis* en ratones BALB/c, el desarrollo de lesiones crónicas caracterizadas por fístulas, microabscesos y gránulos bacterianos se ha asociado con una elevada expresión de IL-10, lo que sugiere un papel relevante de esta citocina en la progresión de la enfermedad (18).

3.1 Tratamientos convencionales para el actinomicetoma

El micetoma se conoce desde hace muchos siglos. Gill en 1832 describió a pacientes de la India con esta condición, que luego fue nombrada por Colebrook como "pie de Madura". Carter nombró a esta enfermedad micetoma, y en 1913, Pinoy describió su doble etiología fúngica y bacteriana (5,19).

El tratamiento de la enfermedad depende de una serie de condiciones, como: el agente etiológico, el grado de avance del proceso (cronicidad y extensión) y las condiciones inmunológicas del paciente(2). La identificación precisa del agente etiológico es esencial para proporcionar un tratamiento eficaz del actinomicetoma. Sin tratamiento, o en casos resistentes, la afectación ósea y visceral progresiva es inevitable (20).

Actualmente, la combinación de sulfato de amikacina y cotrimoxazol, conocida como el régimen de Welsh, es el recomendado para el actinomicetoma, este es administrado en ciclos de 5 semanas. Los pacientes se tratan durante 3 semanas con sulfato de amikacina por vía intramuscular junto con 5 semanas de trimetoprim-sulfametoxazol oral. Sin embargo, en algunos casos, la condición del paciente no mejora (21).

Una de las desventajas de este régimen terapéutico es que las sulfonamidas deben administrarse durante varios meses, incluso años, y lograr solo una tasa de curación del 70% y del 95% con SXT(sulfametoxazol combinado con trimetoprim)-amikacina, adicionalmente estas pueden producir efectos secundarios, como anemia hemolítica y aplásica, urticaria, fotosensibilidad, etc (22).

Independientemente del régimen que se utilice, es obligatorio realizar un seguimiento regular y estrecho de los pacientes, junto con evaluaciones renales, hepáticas y hematológicas y evidencia de ototoxicidad.

Otras complicaciones reconocidas de los antibióticos utilizados en este régimen son la insuficiencia renal y la ototoxicidad, por tanto, cuando aparecen el paciente debe abandonar el tratamiento. Además, en estudios realizados recientemente se han informado casos de resistencia a este régimen, no existiendo muchas alternativas para los casos de farmacoresistencia y los casos en los que se desarrollen efectos secundarios a estos fármacos (23).

3.2 Terapias alternativas para el actinomicetoma

El número de casos de nocardiosis ha aumentado debido a la evolución del patógeno, la supresión inmunitaria del hospedero relacionada con los trasplantes y enfermedades como el sida y el cáncer. Bajo estas condiciones, *Nocardia* se convierte en un patógeno oportunista (24).

En este contexto, el desarrollo de mejores opciones de tratamiento que sean seguras, eficaces y de corta duración para el micetoma se está convirtiendo en una necesidad urgente. Por tanto, nuestro equipo de investigación ha considerado necesario evaluar las actividades *in vitro* e *in vivo* de antimicrobianos naturales frente a *N. brasiliensis* más potentes y menos tóxicos con el fin de obtener mejores alternativas terapéuticas para el tratamiento del actinomicetoma.

3.3 Péptidos antimicrobianos como alternativa terapéutica

Dentro de los antimicrobianos naturales mejores conocidos y estudiados se encuentran los péptidos de defensa del huésped, también conocidos como péptidos antimicrobianos (*AMPs: Antimicrobial Peptides*). Estos péptidos se descubrieron por primera vez en la década de 1980; son componentes esenciales de las defensas inmunitarias innatas de organismos multicelulares (humanos, animales y plantas), y se convierten en la defensa de primera línea contra ataques externos. La mayoría de estos antimicrobianos son pequeños (12 a 50 aminoácidos), y se caracterizan por dominios tanto hidrófobos como hidrófilos. La mayoría de los *AMPs* son

catiónicos y esta carga neta positiva permite que estos péptidos interactúen con las membranas bacterianas cargadas negativamente (25).

Los péptidos antibacterianos se encuentran entre los más estudiados y actualmente se están llevando a cabo intensas investigaciones clínicas y no clínicas para evaluar a estos como posibles antibióticos de próxima generación (26).

En las últimas décadas, más de 300 péptidos bioactivos con propiedades farmacológicas variadas y notables se han purificado de la piel de las ranas, lo que representa una rica fuente de compuestos terapéuticos. La mayoría de estas moléculas exhiben una gama extraordinariamente amplia de actividad antimicrobiana que cubre tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas, así como hongos, virus y protozoos unicelulares. Además de matar un amplio espectro de microorganismos invasores, algunos de estos péptidos multifuncionales regulan selectivamente diferentes procesos biológicos (27).

La rápida actividad bactericida de los *AMPs* los convierte en candidatos prometedores como terapéuticos antiinfecciosos; ya que se ha comprobado que estos poseen actividad antimicrobiana directa y rápida al provocar la interrupción de la integridad física de la membrana microbiana y/o al translocarse a través de la membrana hacia el citoplasma de las bacterias para actuar sobre objetivos intracelulares como el ADN, el ARN y las proteínas (28).

Sus mecanismos antimicrobianos son diferentes de los antibióticos tradicionales; por lo tanto, pueden aplicarse para eliminar varios microbios, incluso los resistentes a medicamentos (29).

Adicionalmente, se considera que las terapias con péptidos tienen ventajas desde la perspectiva de la seguridad en comparación con los fármacos convencionales, ya que sus productos de degradación son aminoácidos naturales y, debido a su corta vida media, pocos péptidos se acumulan en los tejidos. En conjunto, esto reduce el riesgo de seguridad y el riesgo de complicaciones causadas por metabolitos(30). Incluso, los péptidos terapéuticos sintéticos, son generalmente menos inmunogénicos que proteínas y anticuerpos recombinantes. Finalmente, la

administración local, que es la vía de administración más común para los *AMPs*, reduce aún más el riesgo de problemas de toxicidad sistémica (31).

En general, los *AMPs* ofrecen alternativas prometedoras a las terapias estándar como agentes antiinfecciosos e inmunomoduladores con mecanismos de acción que son menos propensos a la inducción de resistencia en comparación con los antibióticos convencionales; ya que se ha considerado que el desarrollo de resistencia bacteriana hacia los *AMPs* es poco probable debido al mecanismo de acción, que implica atacar múltiples objetivos de baja afinidad en lugar de una de un objetivo de alta afinidad como los antibióticos convencionales (32).

Aunque en años pasados se han probado diferentes antibióticos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* en actinomicetomas experimentales por *N. brasiliensis* para encontrar alternativas de tratamiento, hasta el día de hoy no se ha encontrado el antimicrobiano capaz de eliminar la infección de manera segura, eficiente y en un periodo de tiempo corto.

3.4 Péptidos antimicrobianos y su capacidad para modular la respuesta inmune

La mayoría de los péptidos de defensa del huésped tienen una doble actividad biológica. Pueden proporcionar protección contra una amplia gama de patógenos, en primer lugar, por su actividad antimicrobiana directa y, en segundo lugar, a través de su capacidad para modificar el sistema inmunitario modulando las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Un mismo péptido antimicrobiano puede tener ambos efectos o sólo uno u otro (33).

La inmunomodulación ejercida por varios *AMPs* se ha comprobado en diversos estudios, que demuestran que estos péptidos tienen la capacidad de afectar a las respuestas del sistema inmunitario innato y adaptativo, suprimiendo o potenciando la respuesta. Esta capacidad es muy variada y está influenciada por diversos factores como los estímulos ambientales, las células implicadas, la interacción con diferentes receptores, las vías de señalización implicadas y los factores de transcripción a los que se unen (34). Cabe mencionar que muchos *AMPs* han demostrado tener efectos pleiotrópicos dependiendo de la célula sobre la que

actúen; asimismo, se ha visto que la concentración de estos péptidos juega un papel importante en el mecanismo de acción que se desencadena (35).

3.4.1 La respuesta inmune innata modificada por *AMPs*

En cuanto a la inmunidad innata, los *AMPs*, como las α -defensinas y las catelicidinas, se encuentran en los gránulos de los neutrófilos y las células NK. Su función principal es la eliminación intracelular de los patógenos fagocitados, sin embargo, estos péptidos también se liberan en el medio extracelular y pueden actuar como quimiocinas, ya que pueden reclutar diferentes tipos de células, incluidos neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, monocitos y linfocitos al lugar de la infección (35). Este mismo efecto quimiotáctico también puede ser ejercido por algunos *AMPs* sintéticos, entre los que se incluyen los denominados péptidos reguladores de la defensa innata (péptidos IDR), que han demostrado atraer ciertos tipos celulares, incluidos monocitos y neutrófilos (36). Los mecanismos de acción utilizados para lograr este fin son mediante la inducción de la secreción de quimiocinas como MCP-1, RANTES e IL-8, y/o el aumento de la expresión de ciertos receptores, como CCR2 y CXCR4, así como de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) asociados a membrana, entre los que destacan los receptores de formilpéptidos (37). Asimismo, las quimiocinas pueden actuar de forma similar a las defensinas ya que tienen propiedades antimicrobianas demostradas *in vitro* eliminando patógenos como *Listeria monocytogenes* y *E. coli* (38).

Además de su actividad quimiotáctica, péptidos como el HNP-1 (Human Neutrophil Peptide) pueden potenciar la eliminación de patógenos intracelulares por los macrófagos mediante la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos y péptidos. Además, los péptidos HNP1-3 pueden activar a los macrófagos y potenciar su fagocitosis *in vitro* y en modelos murinos *in vivo* (39). Del mismo modo, se ha observado que la catelicidina LL-37 puede activar y potenciar la fagocitosis por parte de los neutrófilos. Este mecanismo está mediado por la síntesis de la quimiocina CXCL8 promovida por la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) p38 y la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) (40). Por otra parte, se ha visto que LL-37 puede inhibir la apoptosis de neutrófilos y, por tanto, prolongar la vida útil de esta

línea celular mediante la activación del receptor de formil-péptido similar a 1 (FPRL1) y el receptor de nucleótidos P2X7 (41). Además, la modulación inmunitaria ejercida por algunos *AMPs* incluye la capacidad de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno y facilitar la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (42).

3.4.2 La respuesta inmune adquirida modificada por *AMPs*

Los *AMPs* también pueden afectar las respuestas del sistema adaptativo. En este aspecto, los péptidos antimicrobianos son excelentes moléculas que sirven de enlace entre las respuestas inmunitarias innata y adquirida, ya que se sabe que distintos tipos de defensinas y la catelicidina humana LL-37 ayudan a iniciar las respuestas inmunitarias antimicrobianas adaptativas porque reclutan células presentadoras de antígenos (APC) en los focos de infección, incluidas las células dendríticas inmaduras (*iDC: immature Dendritic Cells*), los linfocitos B y los macrófagos (43). El hallazgo de que las HNP1-3 y las β -defensinas humanas (hBD) 1-3 son selectivamente quimioatrayentes para las *iDC* humanas al interactuar con CCR6 apoya este hecho (44). Además del reclutamiento, los *AMPs* también tienen la capacidad de activar y promover la maduración de las células dendríticas (*DCs: Dendritic Cells*), ya que se ha demostrado que la β -defensina de ratón (mBD2) 2 regula al alza la expresión de receptores coestimuladores, como CD40, CD80 y MHC II, de forma similar a los efectos observados con hBD1, hBD3 y HNP-1. Se presume que esta expresión está mediada por la expresión de receptores coestimuladores. Se supone que esta expresión está mediada por la interacción con los TLR 1 y 2, lo que da lugar a la señalización MyD88 (45). Del mismo modo, cuando se exponen a LL-37, las células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos muestran un aumento significativo de la capacidad endocítica, aumentando la capacidad de activar células T naive. Esta notable actividad es importante en la inducción de respuestas inmunitarias específicas de Ag, ya que las *DCs* son las principales células responsables de esta respuesta específica (46).

Es bien sabido que los *AMPs* pueden influir en la polarización de los linfocitos T. Este efecto se demostró en diversos estudios en los que las *DCs* se activaron en

presencia de péptidos, como LL-37 y mBD2, provocando la inducción de una respuesta de tipo Th1. Este mismo efecto también se observa en las células de Langerhans, que son activadas por hBD3, induciendo la secreción de IFN- γ por los linfocitos T, lo que sugiere un sesgo hacia respuestas Th1(47).

Además de la quimioatracción de las DCs, las defensinas, como la hBD1 y la hBD3, poseen la capacidad de quimioatraer diferentes subtipos de linfocitos, incluidos los linfocitos T CD4+ y CD8+ naïve y de memoria, favoreciendo, aún más, los mecanismos efectores de las respuestas adaptativas.

En el contexto de las respuestas inmunitarias humorales, las defensinas también pueden modular esta respuesta; sin embargo, lo hacen de forma diferente, ya que se ha demostrado que pueden actuar como adyuvantes y potenciar la producción de anticuerpos IgG específicos. Por otro lado, los péptidos, como el LL-37, provocan una disminución de la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 por parte de los linfocitos B (48).

Debido a todos los efectos que los AMPs pueden ejercer sobre las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, se piensa que el papel principal de los péptidos antimicrobianos en la eliminación bacteriana es modular la respuesta inmunitaria más que dirigir la eliminación de los patógenos. Esta idea proviene del hecho de que muchos péptidos antimicrobianos pierden su actividad antimicrobiana en condiciones fisiológicas. En cambio, sus actividades inmunomoduladoras permanecen presentes y pueden observarse al añadir suero y cuando se prueban en modelos animales (49).

3.5 Los péptidos antimicrobianos DMS-DA6 y DRS-DA2N

Entre todos los organismos productores de péptidos, se han identificado y caracterizado ampliamente los AMPs aislados de ranas. Entre estos, se encuentran las dermaseptinas (DRS), que son una familia de péptidos policatiónicos con estructura en hélice α presentes en las secreciones cutáneas de las ranas hílidas latinoamericanas. DMS-DA6 Y DRS-DA2N son dos péptidos pertenecientes a la familia de las dermaseptinas, aislados de la piel de la rana mexicana *Pachymedusa dacnicolor*.

DMS-DA6 ha demostrado una notable actividad bactericida frente a bacterias Gram-positivas, incluidas cepas multirresistentes. Este péptido adopta una conformación de hélice α que le permite insertarse en membranas compuestas por lípidos aniónicos y alterar su integridad. Sin embargo, se ha demostrado que su elevada actividad frente a bacterias Gram-positivas no se debe únicamente a la interacción con los lípidos aniónicos de la membrana ni a una mayor estabilidad frente a la proteólisis, sino principalmente a su alta afinidad por el peptidoglicano, lo que favorece la permeabilización de la pared y la membrana bacterianas. Además, DMS-DA6 no presenta actividad hemolítica cuando se evalúa en eritrocitos humanos o murinos a concentraciones de 10 y 50 μ M (50).

Por otro lado, DRS-DA2N ha demostrado una potente actividad antimicrobiana *in vitro* frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, incluidas cepas multirresistentes, así como frente a diversas especies de *Candida*, a concentraciones micromolares. Asimismo, este péptido presenta actividad citotóxica selectiva sobre leucocitos humanos y murinos, sin afectar otras células, como eritrocitos ni células epiteliales primarias o transformadas.

El mecanismo de acción de DRS-DA2N consiste en la rápida permeabilización de la membrana plasmática, lo que induce la muerte tanto de bacterias como de células inmunitarias. Además, en un modelo murino de peritonitis no infecciosa, se demostró que la forma corta de DRS-DA2N induce selectivamente la muerte de células inflamatorias *in vivo* y ejerce un efecto inmunorregulador local, pero no sistémico, al reducir el número de leucocitos presentes en la cavidad peritoneal tras la inducción de la inflamación (51).

CAPÍTULO 2

Justificación

El tratamiento convencional utilizado en la terapia del actinomicetoma es de larga duración, provoca efectos adversos serios y han surgido cepas resistentes a éste.

Por lo tanto, se necesitan nuevas opciones de tratamiento que sean eficaces, menos tóxicas y de corta duración. En este trabajo se evaluará el efecto inmunomodulador y microbicida *in vitro* e *in vivo* de los péptidos antimicrobianos DMS-DA6 y DRS-DA2N contra *N. brasiliensis*.

CAPÍTULO 3

Hipótesis

Los péptidos antimicrobianos DMS-DA6 y DRS-DA2N tienen actividad inmunomoduladora y microbicida en un modelo experimental de actinomicetoma por *N. brasiliensis*.

CAPÍTULO 4

Objetivo general

Evaluar el efecto inmunomodulador y microbicida de los péptidos antimicrobianos DMS-DA6 y DRS-DA2N en un modelo experimental de actinomicetoma por *N. brasiliensis*.

CAPÍTULO 5

Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad microbicida de los péptidos antimicrobianos DMS-DA6 y DRS-DA2N contra *N. brasiliensis in vitro*.
2. Determinar la eficacia del tratamiento con los péptidos antimicrobianos DMS-DA6 y DRS-DA2N contra *N. brasiliensis in vivo* en ratones BALB/c.
3. Identificar los efectos inmunomoduladores producidos por los péptidos antimicrobianos DMS-DA6 y DRS-DA2N en la infección por *N. brasiliensis in vivo* en ratones BALB/c.

CAPÍTULO 6

Materiales y Métodos

6.1. Purificación e identificación de péptidos mediante espectrometría de masas.

Se obtuvieron 200 μ L de exudado cutáneo fresco apretando suavemente la parte lateral-dorsal de la piel de la rana *Pachymedusa dacnicolor* (52). Para la identificación mediante espectrometría de masas, las muestras se prepararon según el método de «gotita seca» (53) con CHCA (ácido B-ciano-4-hidroxicinámico, Applied Biosystems) (5 mg/mL) como matriz en ACN/TFA acuoso al 0,1 % (1:1). Los experimentos MALDI-TOF se llevaron a cabo utilizando un analizador proteómico 4700 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, Francia) equipado con un láser de diodo bombeado Nd:YAG: $\lambda = 355$ nm, una duración de pulso de 4 ns y una frecuencia de repetición de 200 Hz. Los experimentos MALDI-TOF/TOF se realizaron en condiciones CAD (N_2 , $5,3 \times 10^{-5}$ Pa) a 1 keV (energía de colisión). La ventana de iones precursores es de $\pm 2u$. Los experimentos MS y MS/MS se calibraron externamente utilizando mezclas de péptidos clásicos.

6.2 Síntesis de péptidos en fase sólida.

Los péptidos se sintetizaron mediante síntesis automatizada en fase sólida utilizando química Fmoc/tBu en el sistema Activo-P11 (Activotec) y, a continuación, se purificaron mediante HPLC (Waters, columna C18). La identidad de los péptidos se validó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (MS Voyager, Applied Biosystems). Teniendo en cuenta la presencia de un residuo de triptófano en la secuencia, las concentraciones se determinaron mediante espectroscopia UV (Nanodrop, Labtech.com), asumiendo un coeficiente de extinción para el triptófano D280 de $5600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

6.3 Actividad antibacteriana *in vitro*

Se cultivó *Nocardia brasiliensis* ATCC700358 (Salinas-Carmona et al., 2010) en matraces Erlenmeyer de 125 ml, los cuales contenían 30 ml de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) estéril (121°C por 15 minutos a 15 libras de presión). Una vez sembrado se incubó a 37°C durante 72 horas (para llegar a fase exponencial). Debido a que los organismos son difíciles de fragmentar y crecen en grupos en el caldo, se requiere cierta agitación del organismo con perlas de vidrio, con un margen para la sedimentación de los grupos de organismos más grandes.

Posteriormente se preparó una suspensión unicelular, para la cual la masa bacteriana se recuperó de los matraces y se colocó en tubos cónicos (Falcón) con tapón de rosca, después se centrifugaron a 2,500 rpm durante 15 minutos. Una vez centrifugado se decantó el sobrenadante y la masa bacteriana depositada en el sedimento se lavó con solución salina estéril, repitiendo el proceso de centrifugación y lavado 2 veces más. Después de realizar los lavados las bacterias se trituraron y homogenizaron con un Potter-Evelham.

Después a la masa bacteriana se adicionó 1 mL de solución salina y se diluyó con caldo BHI. A continuación, la suspensión del organismo se ajustó a la turbidez visual del estándar de McFarland de 0.5 McFarland.

En una microplaca de 96 pocillos se agregó 0.1 mL de esta suspensión previamente diluida con caldo Müeller-Hinton para obtener una concentración final de 5×10^4 Unidades Formadoras de Colonias (*CFU: Colony Forming Unit*) por pocillo. Así mismo se añadió un volumen igual de caldo Mueller-Hinton con diluciones seriadas de los péptidos antimicrobianos a ensayar.

Después de 3 días de incubación a 37°C, las placas se leyeron en un lector E.L.I.S.A. y se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (*MIC: Minimum Inhibitory Concentration*) como la concentración más baja de fármaco que inhiba totalmente el crecimiento de *Nocardia brasiliensis*.

Para evaluar si el péptido es bacteriostático o bactericida, las placas se centrifugaron a 3000 g durante 10 min, y el medio de los pocillos se retiró y se

reemplazó por medio fresco. A continuación, estas placas se incubaron durante 72 horas para evaluar el crecimiento bacteriano y determinar la Concentración Mínima Bactericida (*MBC: Minimum Bactericidal Concentration*).

6.4 Modelo murino de actinomicetoma

En esta investigación se trabajaron con ratones BALB/c hembras de 10 a 14 semanas de edad, libres de patógenos, mantenidos bajo condiciones BSL2 en el laboratorio de experimentación de animal del servicio de Inmunología. Se les proporcionó alimento comercial LabDiet, la cual contiene una composición bromatológica ideal para alimento de roedores de laboratorio y agua estéril ad libitum. Los animales se observaron diariamente y la iluminación fue 12/12 controlada automáticamente, de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999.

La infección fue inducida inoculando 1×10^6 CFU de *N. brasiliensis* en el cojinete plantar de la pata izquierda trasera.

6.5 Tratamiento con los péptidos antimicrobianos DMS-DA6 y DRS-DA2N y el antibiótico Linezolid

Una vez que el actinomicetoma se encontró establecido (día 60 de infección) se comenzó la administración de los tratamientos a los ratones infectados. En esta investigación se utilizaron un total de 40 animales, los cuales fueron ratones hembra de la cepa BALB/c de entre 10 a 14 semanas de edad. Estos 40 ratones se distribuyeron en 8 grupos de 5 ratones cada uno, a los cuales se les administraron diferentes tratamientos. La administración de péptidos antimicrobianos fue vía intramuscular (cerca del cojinete plantar infectado) y la del antibiótico Linezolid vía subcutánea:

- **Grupo #1:** grupo control sano (los ratones de este grupo no fueron infectados ni tratados) para conocer las poblaciones de leucocitos y nivel de citocinas basales en ratones sanos.

- **Grupo #2:** grupo control sin tratamiento (a los ratones de este grupo no se les administró tratamiento) para observar el curso de la infección sin tratamiento.
- **Grupo #3:** se administró el péptido DRS-DA2N en una concentración de 12.5 mg/kg 2 veces por semana durante 3 semanas.
- **Grupo #4:** se administró el péptido DMS-DA6 en una concentración de 12.5 mg/kg 2 veces por semana durante 3 semanas.
- **Grupo #5:** se administraron los péptidos DRS-DA2N y DMS-DA6 en una concentración de 5 mg/kg (cada péptido) 2 veces por semana durante 3 semanas.
- **Grupo #6:** se administró el péptido DRS-DA2N en una concentración de 5 mg/kg 2 veces por semana durante 3 semanas y el antibiótico Linezolid en una concentración de 25 mg/kg cada 12 horas durante 4 semanas.
- **Grupo #7:** se administró el péptido DMS-DA6 en una concentración de 5 mg/kg 2 veces por semana durante 3 semanas y el antibiótico Linezolid en una concentración de 25 mg/kg cada 12 horas durante 4 semanas.
- **Grupo #8:** se administró el antibiótico Linezolid en una concentración de 25 mg/kg cada 12 horas durante 4 semanas.

Los péptidos fueron disueltos en solución salina; en cada dosis se administraron 20 µL con ayuda de una jeringa. El esquema terapéutico utilizado para los 8 grupos se muestra a continuación:

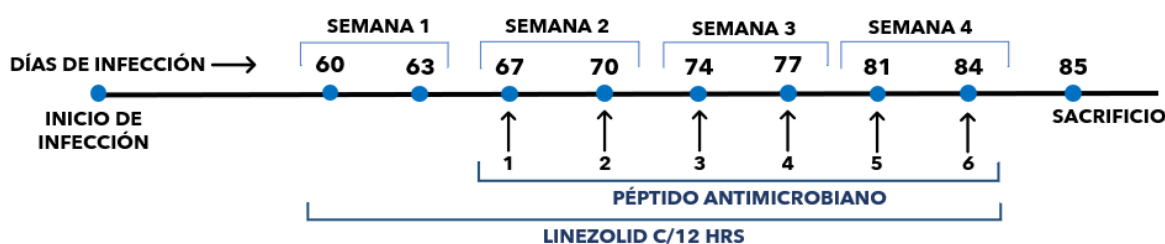


Figura 2. Esquema de tratamientos con péptidos antimicrobianos y el antibiótico Linezolid.

En el esquema terapéutico que se utilizó para los grupos #6 y #7 consistió en administrar solamente el antibiótico Linezolid durante la primera semana; a partir de

la segunda semana de tratamiento se inició con la administración del péptido antimicrobiano en cuestión en conjunto con el antibiótico.

Al momento de administrar los tratamientos se observó durante 30 minutos el comportamiento del ratón y periódicamente durante las primeras 24 h (con especial atención durante las primeras 4 horas) y posteriormente todos los días, durante un total de 28 días después de la primera administración del tratamiento. De igual manera se evaluaron efectos irritantes en la pata del ratón (eritema, edema y recuperación completa del cabello).

24 horas después de administrar la última dosis de tratamiento se aplicó una dosis final de anestesia a el animal con 100µl/20g de Ketamina/Xilacina, posteriormente la eutanasia se realizó por dislocación cervical, de acuerdo con la NOM 062-ZOO-1999 9.5.3.2, el animal no debe moverse después del procedimiento y se verificó la muerte por ausencia de respiración y latido cardíaco.

6.6 Evaluación del tratamiento con péptidos antimicrobianos

Para determinar la eficacia* de los tratamientos con los péptidos antimicrobianos se evaluaron los siguientes parámetros:

- Supervivencia de los ratones¹.
- Peso de los ratones¹.
- Inflamación de cojinete plantar¹.
- Unidades Formadoras de Colonias (CFU) en cojinete plantar infectado².
- Cortes histológicos del cojinete plantar para observar la presencia de infiltrado celular y de colonias bacterianas².
- Análisis de poblaciones de monocitos, macrófagos, neutrófilos y Linfocitos T CD4+ y CD8+ mediante citometría de flujo en sangre periférica, bazo y cojinete plantar infectado².

- Cuantificación en suero de las siguientes citocinas: IFN- γ , TNF- α , IL-12p70, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, MCP-1, GM-CSF, IL-17A, IL-23, IL-10, IL-27 e IFN- β mediante citometría de flujo².

¹Estos parámetros fueron evaluados en ratones vivos, durante las 4 semanas de administración de tratamientos.

²Estos parámetros fueron evaluados una vez que se sacrificaron los ratones.

*Eficacia: para este trabajo se consideró que un tratamiento es eficaz cuando elimina o controla la infección y produce una mejoría clínica significativa, sin generar una toxicidad inaceptable.

6.6.1 Seguimiento Clínico

Una vez que se comenzó con la aplicación del esquema terapéutico con los péptidos antimicrobianos se utilizó un registro individual para los ratones, el cual evaluó signos clínicos de toxicidad aguda, actividad locomotora, sensibilidad al sonido, comportamiento exploratorio, comportamiento agresivo, convulsiones, tono muscular en extremidades, temblores, lagrimeo, defecación, micción, cambios en la respiración, secreciones nasales, cianosis y piloerección. Así mismo, se realizó un seguimiento de la supervivencia y peso de cada ratón.

De igual manera, la inflamación observada en el cojinete plantar de cada ratón se midió con ayuda de un vernier cada tres días durante el curso del estudio, y se obtuvo el volumen empleando la ecuación elipsoide (ancho x alto x largo) multiplicando el producto por el factor 0.5235999.

6.7 Procesamiento de tejidos

6.7.1 Obtención de sangre periférica venosa

24 horas después de la última administración del péptido y antes de realizar el sacrificio de los ratones, se obtuvo sangre periférica venosa mediante punción retro

orbital. Al momento de la recolección de la sangre, se colocaron 100 µl en un tubo con heparina y la sangre restante se colocó en un tubo sin anticoagulante.

La sangre con heparina se destinó para el análisis por citometría de flujo, mientras que la sangre sin anticoagulante se destinó para obtener el suero para la posterior cuantificación de citocinas por multiplex.

6.7.2 Digestión del cojinete plantar

El cojinete plantar se obtuvo en un ambiente estéril de los diferentes grupos de ratones para colocarse en medio RPMI completado (cRPMI) con glutamina, piruvato sódico 1 mM, HEPES 10 mM, 1% aminoácidos no esenciales, 100 U de penicilina/ml, 100 g de estreptomina/ml y 10% suero bovino fetal. Se añadieron 0.7 mg de colagenasa XI disuelta en PBS a cada cojinete plantar y se procedió a incubar durante 30 min a 37°C. El tejido digerido se rompió con ayuda de tijeras y bisturí para después ser empujado suavemente a través de un filtro de células de 70 µm. Los glóbulos rojos se lisaron con la solución de Gey, y posteriormente se realizó un lavado para resuspender las células en cRPMI. El número total de células por cojinete se determinó usando una Cámara de Neubauer y se ajustó a la concentración adecuada para el análisis de células por citometría de flujo.

6.7.3 Digestión de bazo

Una vez que se realizó el sacrificio del ratón, se extrajo el bazo y se colocó en una caja Petri que contenía medio RPMI completo con glutamina, piruvato sódico 1 mM, HEPES 10 mM, 1% aminoácidos no esenciales, 100 U de penicilina/mL, 100 gramos de estreptomina/mL; posteriormente con ayuda de pinzas de disección estériles sin dientes y con estrías en las caras internas, se maceró el órgano para obtener una suspensión celular.

Las células obtenidas se recuperaron en tubos cónicos estériles de 15 mL. Cada tubo se centrifugó durante 10 minutos a 1800 rpm, se descartó el sobrenadante y el botón de células se concentró a 1 mL, después se añadió solución de lisis 1X

(NH₄Cl) para eliminar los eritrocitos y se agitó gentilmente el tubo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se volvió a centrifugar cada tubo durante 10 minutos a 1800 rpm, se descartó el sobrenadante y el botón celular restante se lavó en 2 ocasiones más con 10 mL de PBS. Las células se suspendieron en un volumen total de 2 mL. Posteriormente, a partir de cada solución celular se determinó el número total de células por cada bazo extraído con la ayuda de una Cámara de Neubauer.

6.8 Determinación de carga bacteriana en cojinete plantar infectado

Utilizando 0.1 ml de homogenizado del cojinete plantar de los ratones de los diferentes grupos se realizaron diluciones seriadas para su cultivo en agar BHI, posteriormente se incubó a 37°C durante 7 días; cada 24 horas se observó si existía crecimiento de *CFU* para la determinación de carga bacteriana por el método de Miles & Misra.

6.9 Cuantificación de poblaciones celulares por citometría de flujo

Las células obtenidas de cojinete plantar, bazo y sangre se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/ml con PBS frío (4°C). Después las células se lavaron en 1 ml de PBS/BSA y se incubaron con anticuerpos monoclonales a la dilución recomendada por el proveedor para detectar los marcadores CD3, CD4, CD8, F4/80, CD11b y Ly6g. Posteriormente se realizó una incubación durante 30 minutos a 4°C, evitando la luz directa, para después realizar un lavado con 1 ml de PBS. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 500 µl de PBS para su adquisición por citometría de flujo.

El análisis de datos se realizó en el citómetro BD LSRFortessa: por cada tubo de citometría se adquirieron al menos 50,000 eventos y los resultados se analizaron utilizando el BD FACSDiva Software.

Los siguientes anticuerpos monoclonales de superficie de rata anti-ratón conjugados con fluorocromos fueron utilizados en este trabajo:

<u>Anticuerpos de Superficie</u>				
<u>Anticuerpo</u>	<u>Cantidad (µl)</u>	<u>Clona</u>	<u>Fluorocromo</u>	<u>Compañía</u>
<u>Anti-CD3</u>	<u>2.5</u>	<u>17A2</u>	<u>APC-Cy7</u>	<u>BD Biosciences</u>
<u>Anti-CD4</u>	<u>1</u>	<u>RM4-5</u>	<u>Pacific Blue</u>	<u>BD Biosciences</u>
<u>Anti-CD8</u>	<u>1</u>	<u>53-6.7</u>	<u>V500</u>	<u>BD Biosciences</u>
<u>Anti-Ly6G</u>	<u>2.5</u>	<u>1A8</u>	<u>PE-Cy7</u>	<u>BD Biosciences</u>
<u>Anti-F4/80</u>	<u>2.5</u>	<u>T45-2342</u>	<u>Alexa Fluor 488</u>	<u>BD Biosciences</u>
<u>Anti-CD11b</u>	<u>2.5</u>	<u>M1/70</u>	<u>Alexa Fluor 647</u>	<u>BD Biosciences</u>

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales para citometría de flujo. Se especifican las características de los anticuerpos utilizados para el análisis por citometría de flujo.

6.10 Cuantificación de citocinas en suero

Las citocinas se midieron en el suero de ratones BALB/c control o infectados y tratados con el sistema LEGENDplex Mouse Inflammation Panel 13-plex (BioLegend), siguiendo las instrucciones del fabricante para la cuantificación de IFN- γ , TNF- α , IL-12p70, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, MCP-1, GM-CSF, IL-17A, IL-23, IL-10, IL-27 e IFN- β por citometría de flujo. La adquisición de muestras se realizó con un citómetro de flujo BD FACSCanto II (BD Biosciences) y el software BD FACSDiva v9.0.1. Los datos se analizaron con el programa LEGENDplex (<https://legendplex.qognit.com>).

6.11 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de inclusión: ratones sanos de la cepa Balb/c de 10 a 14 semanas de edad que se encuentren pesando entre 20 y 25 gramos.

Criterios de exclusión: ratones de alguna cepa diferente a la Balb/c, ratones menores a 10 semanas de edad y mayores a 14, ratones que pesen menos de 20 gramos, y ratones que presenten algún signo de enfermedad.

Criterios de eliminación: ratones que después de 30 días no presenten las lesiones típicas del actinomicetoma, ratones que pierdan el 20% de su peso al inicio del experimento.

6.12 Análisis Estadístico

Para calcular la cantidad de animales necesarios para obtener datos estadísticamente confiables, se utilizó la herramienta bioinformática “Calculadora de Tamaño muestral GRANMO” (Versión 7.12), la cual nos indica lo siguiente:

“Aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta inferior al 0.2 en un contraste bilateral, se necesitan 5 sujetos en cada grupo para detectar una diferencia mínima de 2 entre dos grupos, asumiendo que existen 7 grupos y una desviación estándar de 0.7. Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 10%.”

En este estudio se utilizarán 7 grupos formados por 5 animales cada uno, los cuales serán sacrificados en el día 66 después de la infección; por lo tanto, la n para la fórmula corresponde a un total de 35 animales.

En la estadística descriptiva se reportaron frecuencias y porcentajes para variables categóricas. Para las variables cuantitativas se reportaron medidas de tendencia central y dispersión (media/mediana; desviación estándar/rango intercuartil), previa valoración de la distribución de las variables por medio de la prueba de Kolmogórov-Smirnov. Se compararon variables categóricas por medio de la prueba de Chi cuadrado de Pearson o test exacto de Fisher. Para las variables cuantitativas se compararon grupos por medio de la prueba ANOVA para grupos independientes. Se consideró un valor de $p < 0.05$ y un intervalo de confianza al 95% como estadísticamente significativo. Se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism 8.0.1.

CAPÍTULO 7

Resultados

7.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Bactericida (MBC) *in vitro* de los péptidos antimicrobianos contra *N. brasiliensis*.

Los péptidos se adicionaron a las diferentes concentraciones señaladas en la sección de material y métodos junto con *N. brasiliensis* para determinar si eran capaces de inhibir el crecimiento y/o ejercer un efecto bactericida.

El péptido “DMS-DA6” demostró tener tanto actividad inhibitoria como microbica; mientras que el péptido “DRS-DA2N” demostró solo tener actividad inhibiendo el crecimiento de *Nocardia brasiliensis*.

Péptido	Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	Concentración Mínima Bactericida (MBC)
DMS-DA6	500 M	1 mM
DRS-DA2N	1 mM	-

Tabla 2. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Bactericida (MBC) de los péptidos antimicrobianos “DMS-DA6” y “DRS-DA2N”.

7.2 Determinación de la eficacia del tratamiento con péptidos antimicrobianos contra *N. brasiliensis in vivo*.

Después de determinar la MIC y MBC de los péptidos antimicrobianos, se decidió solo administrar a nuestro modelo animal los péptidos “DA6” y “N”, debido a que solo estos dos péptidos demostraron tener actividad antibacteriana contra *N. brasiliensis*.

Para determinar la eficacia de los tratamientos con los péptidos antimicrobianos se evaluaron los siguientes parámetros en los ratones tratados: supervivencia, peso, inflamación del tejido infectado y cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (CFU).

Al administrar los péptidos se observó que el péptido “N” ocasionaba la muerte de los ratones después de aproximadamente 30 minutos de administrar el péptido; por

lo que al finalizar el esquema de tratamiento solo sobrevivieron 2 ratones de los 5 con los que se comenzó.

Otro tratamiento que ocasionó la muerte de 1 ratón de los 5 con los que se comenzó fue la administración en conjunto de los péptidos “DA6” y “N”.

Los 4 tratamientos restantes no ocasionaron la muerte de ratones, por lo que su aplicación se considera segura.

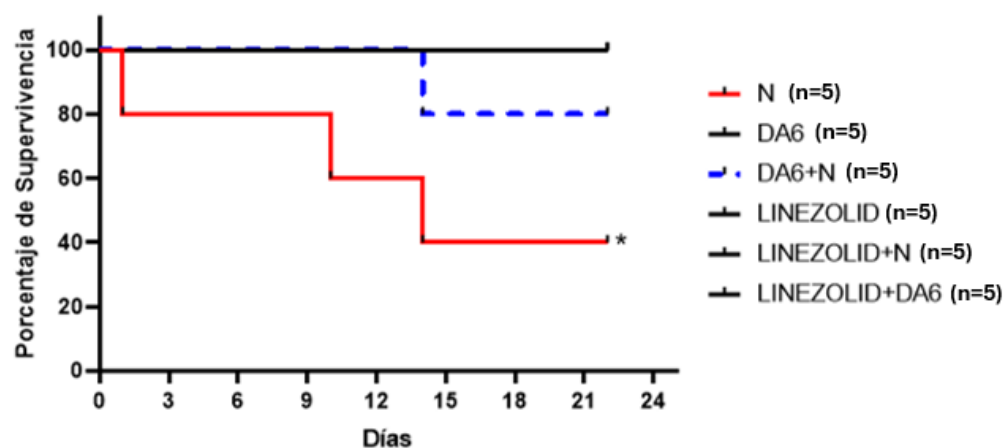


Figura 3. Grafica de supervivencia de los ratones tratados con péptidos antimicrobianos y Linezolid. De los 6 tratamientos que se administraron a los ratones Balb/c solo 2 de ellos ocasionaron la muerte de ratones. Log-rank test. $n=5$ * $p<0.05$.

Así mismo, se monitoreo el peso de los ratones durante el tiempo que duraron los tratamientos; esto como un indicador de buena salud en los ratones. Al terminar los tratamientos se comparó el peso del ratón al inicio del tratamiento contra el peso del ratón al finalizar dicho tratamiento.

El peso de los ratones no se vio alterado por ninguno de los tratamientos utilizados, ya que se encontraron diferencias de alrededor el 5% de pérdida o ganancia de peso; lo que nos indica que los ratones gozaban de un buen estado de salud en general durante la administración del tratamiento.

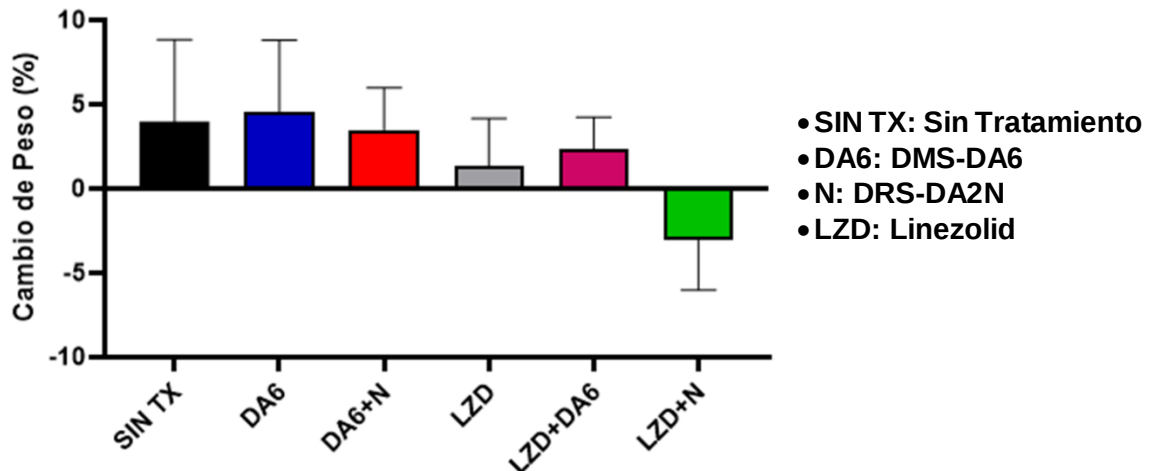


Figura 4. Cambio de peso de los ratones durante la administración de los tratamientos con los péptidos antimicrobianos y Linezolid. Se comparó el peso de los ratones al inicio y al final del tratamiento como un indicador de buen estado de salud. Las diferencias se expresan en porcentaje. Prueba de Kruskal-Wallis, comparación múltiple de Dunn. $n=4-5$ ns $p>0.05$.

Otro de los parámetros evaluados para determinar la eficacia de los tratamientos con los péptidos antimicrobianos fue determinar si existía un cambio de volumen en el tejido infectado de los ratones. Para realizar dicha determinación se midió el cojinete plantar infectado de los ratones durante los tratamientos con ayuda de un vernier, y por medio de la ecuación de la elipse se determinó el volumen total del miembro afectado.

En la mayoría de los tratamientos, con excepción del tratamiento donde se administraron en conjunto los péptidos “DA6” y “N” se observó una disminución del volumen del cojinete plantar infectado al finalizar el esquema de tratamiento.

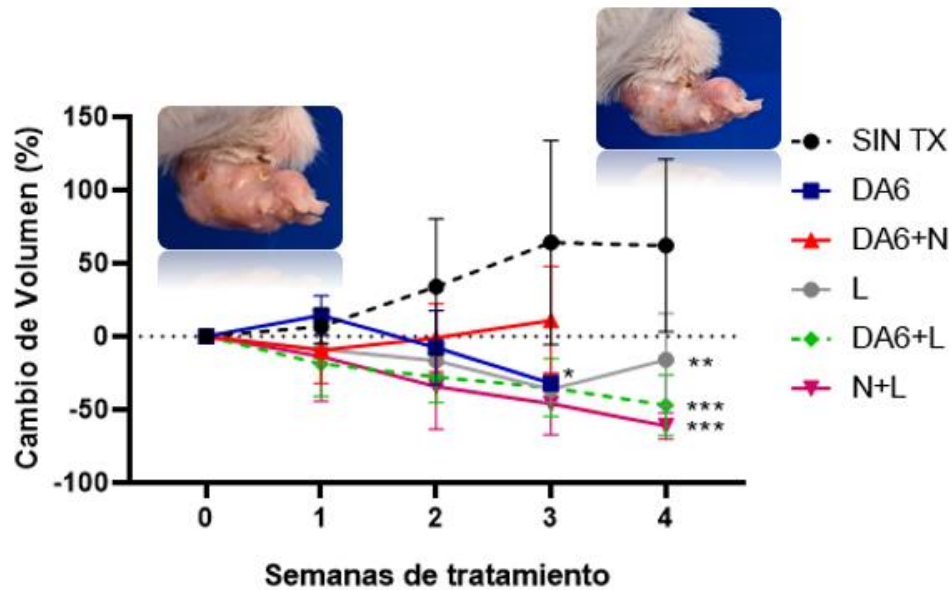


Figura 5. Cambio de volumen del cojinete plantar infectado de los ratones tratados con péptidos antimicrobianos y Linezolid. El volumen del cojinete plantar infectado disminuyó al finalizar el tratamiento con péptidos antimicrobianos y Linezolid, en comparación con el volumen del cojinete plantar sin tratamiento. ANOVA de una vía, muestras pareadas, comparación múltiple de Dunn. $n=4-5$ * $p<0.05$ ** $p<0.01$.

Uno de los parámetros considerados más importantes a evaluar, son las Unidades Formadoras de Colonias (CFU). Para realizar la evaluación de este parámetro, se obtuvieron los cojinetes plantares infectados, se maceraron y a partir de este macerado se realizaron diluciones seriadas para determinar las CFU mediante el método de Miles & Misra.

Sorprendentemente se observó una disminución en las CFU en todos los tratamientos probados, destacando que estos péptidos conservan su actividad antimicrobiana en modelos *in vivo*.

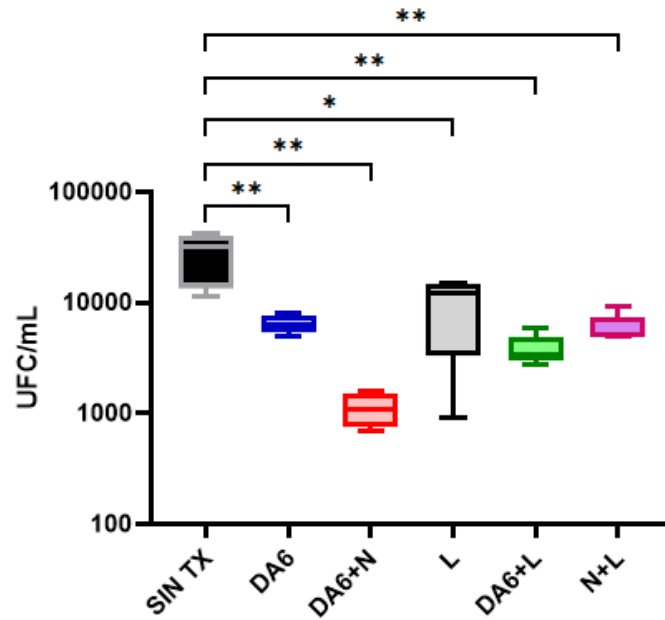


Figura 6. Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (CFU) en cojinete plantar infectado. Se cuantificaron las CFU al finalizar los tratamientos con los péptidos antimicrobianos y Linezolid. Se observó una disminución de carga bacteriana en ratones infectados y tratados en comparación con ratones infectados sin tratamiento. Prueba de t no pareada, n=4-5 *p<0.05.

7.3 Identificación de los efectos inmunomoduladores de los péptidos antimicrobianos en la infección por *N. brasiliensis* *in vivo*.

Para determinar si los péptidos antimicrobianos pueden modular la respuesta inmune de los ratones infectados con *N. brasiliensis*, al finalizar los tratamientos se realizó el análisis por citometría de flujo de macrófagos, monocitos, neutrófilos y linfocitos T CD4+ y CD8+ en el cojinete plantar infectado, el bazo y la sangre. Una parte representativa del tejido infectado se destinó para realizar la tinción de Hematoxilina y Eosina y observar la histopatología de la lesión. Por último, se obtuvo el suero de los ratones para cuantificar las citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , IFN- β , IL-10, IL-17, IL-23, GM-CSF, MCP-1 y IL-27 utilizando Multiplex.

7.3.1 Identificación de los efectos inmunomoduladores de los péptidos antimicrobianos en la infección por *N. brasiliensis* *in vivo*.

Al finalizar el tratamiento con los péptidos antimicrobianos se extrajeron el cojinete plantar, el bazo y sangre periférica de los ratones, de los cuales se obtuvieron suspensiones celulares que se utilizaron para realizar el marcaje con los anticuerpos monoclonales de superficie anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD11b, anti-Ly6G y anti-F4/80. Después se analizaron por citometría de flujo con el fin de cuantificar las poblaciones de monocitos, neutrófilos y Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en los tejidos mencionado anteriormente.

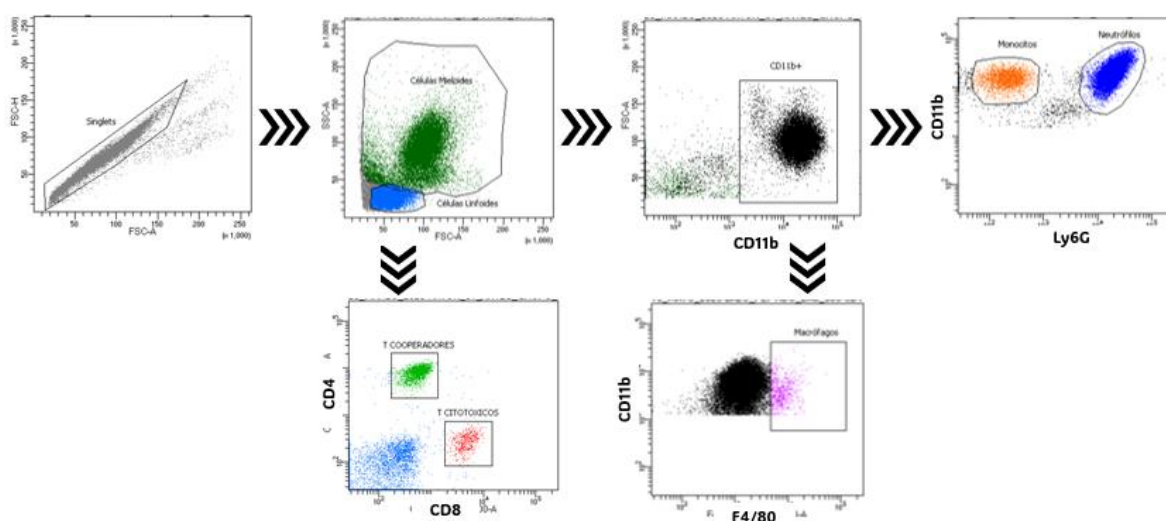


Figura 7. Dot plots representativos de la citometría de flujo en cojinete plantar, bazo y sangre periférica venosa. A partir de los datos adquiridos de las suspensiones celulares se realizó la cuantificación de las poblaciones de monocitos, neutrófilos y Linfocitos T CD4+ y CD8+.

7.4 Identificación de los efectos inmunomoduladores de los péptidos antimicrobianos en cojinete plantar.

Al analizar el grupo de ratones sin infección y compararlo con el grupo infectado sin tratamiento no se observaron cambios algunos en los porcentajes de Linfocitos T CD4+ y CD8+. De la misma manera, al finalizar los tratamientos y analizar las poblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+, se observó que existe una tendencia a aumentar los porcentajes de ambas estirpes celulares con la administración de los

diferentes tratamientos, sin embargo, ninguno causó modificaciones estadísticamente significativas.

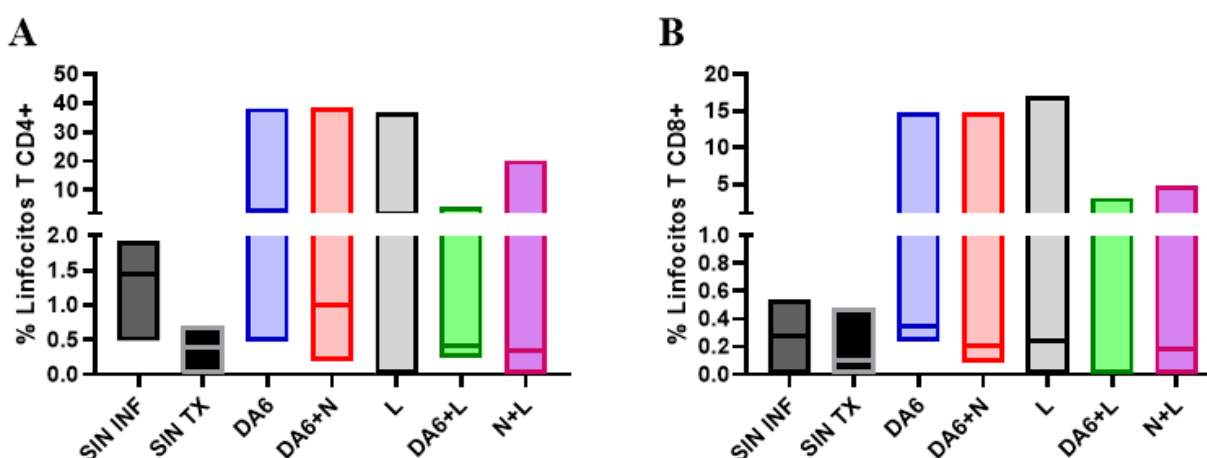


Figura 8. Porcentaje de Linfocitos T CD4+ y CD8+ en cojinete plantar. La administración de los diferentes tratamientos no modificó los porcentajes de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en el sitio de la lesión. A y B) Kruskal-Wallis test, comparación múltiple de Dunn n=4-5 ns: $p > 0.05$.

En cuanto a las poblaciones de células mieloides analizadas, se observó que no existía una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo sin infección y el grupo infectado sin tratamiento en el porcentaje de macrófagos. Por otro lado, el porcentaje de neutrófilos aumentó considerablemente en el grupo infectado sin tratamiento; cabe destacar que en cojinete plantar infectado los neutrófilos son las células más abundantes detectadas por citometría de flujo.

Al buscar modificaciones en los grupos que se administraron los tratamientos, se observa una tendencia en el aumento de macrófagos en los grupos tratados con “DA6”, “DA6+N” y los tratamientos combinados de Linezolid y los péptidos antimicrobianos, sin embargo, no son resultados estadísticamente significativos. Por otro lado, en la población de neutrófilos no se encontraron modificaciones algunas en los porcentajes de estas células al comparar el grupo infectado sin tratamiento con los grupos tratados con los péptidos antimicrobianos y Linezolid.

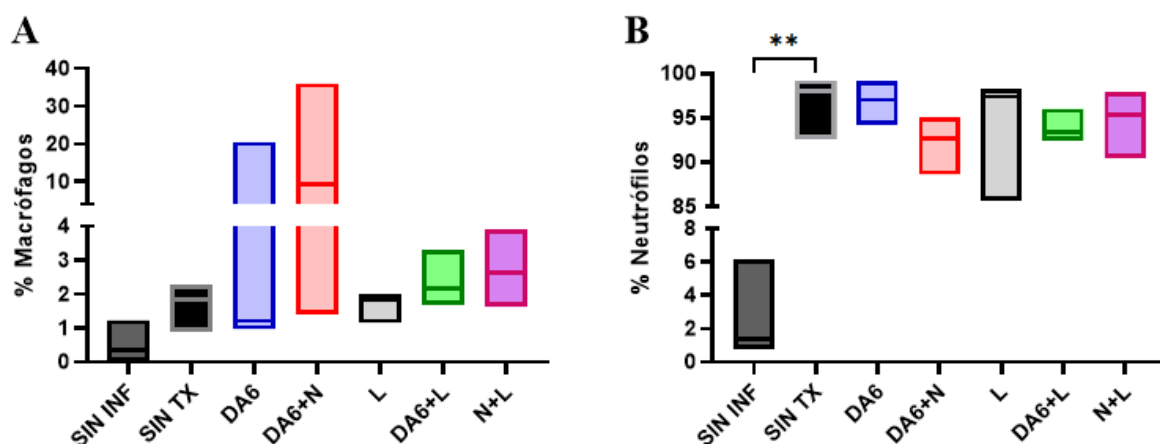


Figura 9. Porcentaje de macrófagos y neutrófilos en cojinete plantar. La administración de los diferentes tratamientos no modificó los porcentajes de macrófagos y neutrófilos. A y B) Kruskal-Wallis test, comparación múltiple de Dunn n=4-5 ns: $p > 0.05$ ** $p < 0.01$.

7.5 Identificación de los efectos inmunomoduladores de los péptidos antimicrobianos en bazo.

Se realizó el análisis por citometría de flujo de poblaciones de monocitos, macrófagos, neutrófilos y Linfocitos T CD4+ y CD8+ en bazo. Esto con el fin de detectar si los tratamientos con los péptidos antimicrobianos tenían algún efecto sistémico en estas poblaciones celulares.

En cuanto a el grupo de ratones sin infección y el grupo infectado y no tratado, no se encontraron diferencias algunas en el porcentaje de Linfocitos T CD4+ y CD8+.

Por otro lado, en los porcentajes de Linfocitos T CD4+ se observó que el tratamiento de los dos péptidos “DA6+N”, así como los tratamientos combinados de los péptidos y el antibiótico “DA6+L” y “N+L” disminuían en diferente proporción esta población celular en comparación con los ratones infectados y no tratados.

Este mismo comportamiento se observó en los porcentajes de Linfocitos T CD8+, donde solamente el tratamiento con el péptido DA6 solo y en combinación con el péptido N causan una disminución de esta población celular. Mientras que el tratamiento con Linezolid solo y en combinación con los péptidos no ocasiono modificación alguna.

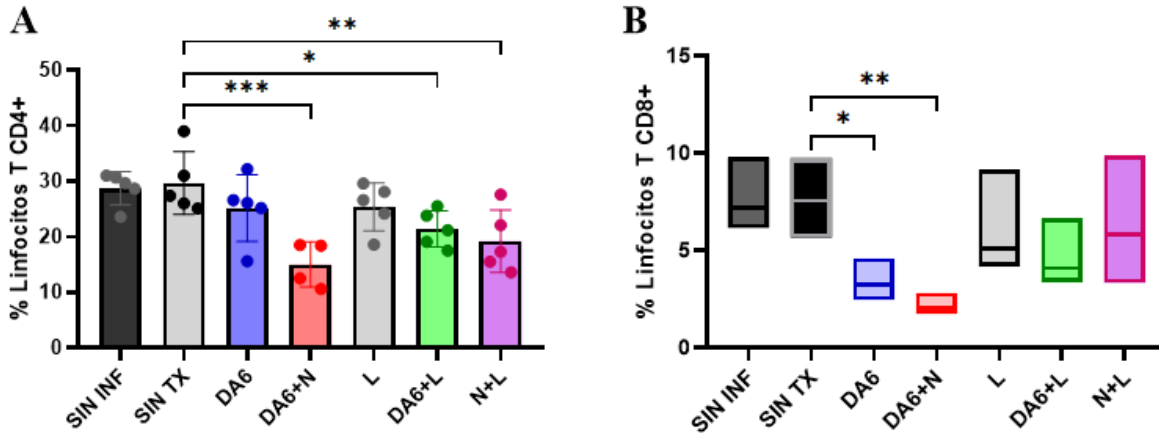


Figura 10. Porcentaje de Linfocitos T CD4+ y CD8+ en bazo. La administración de ciertos tratamientos modificó los porcentajes de Linfocitos T CD4+ y CD8+ presentes en bazo. A) ANOVA de una vía, comparación múltiple de Dunnet. B) Kruskal-Wallis test, comparación múltiple de Dunn n=4-5 * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

En la población de células mieloides, en monocitos se observó que los ratones sin infección presentaban porcentajes altos de estas células en comparación con los ratones infectados y no tratados.

En cuanto a los grupos infectados y tratados, se encontró que los grupos a los que se les administró el péptido “DA6” en conjunto con el péptido N o en combinación con Linezolid presentaban porcentajes más bajos de monocitos que el grupo infectado y no tratado; sin embargo, estos cambios no eran estadísticamente significativos. Por otro lado, los tratamientos restantes no mostraron modificaciones aparentes en el porcentaje de estas células.

En lo que respecta a la población de macrófagos, se puede observar que los ratones no infectados presentan un porcentaje elevado de estas células en comparación con los ratones infectados y no tratados. Por otro lado, al comparar los grupos a los que se les administró los tratamientos, se encontró que solo la administración del tratamiento combinado del péptido y el antibiótico “DA6+L” ocasionaban un aumento significativo en el porcentaje de estas células en comparación con los ratones sin tratamiento.

En la población de neutrófilos se observó que los ratones infectados presentaban un porcentaje mucho mayor de estas células en comparación con los ratones sin

infección. Por otro lado, los ratones infectados y tratados presentaron porcentajes de esta población celular muy similares a los ratones infectados y no tratados.

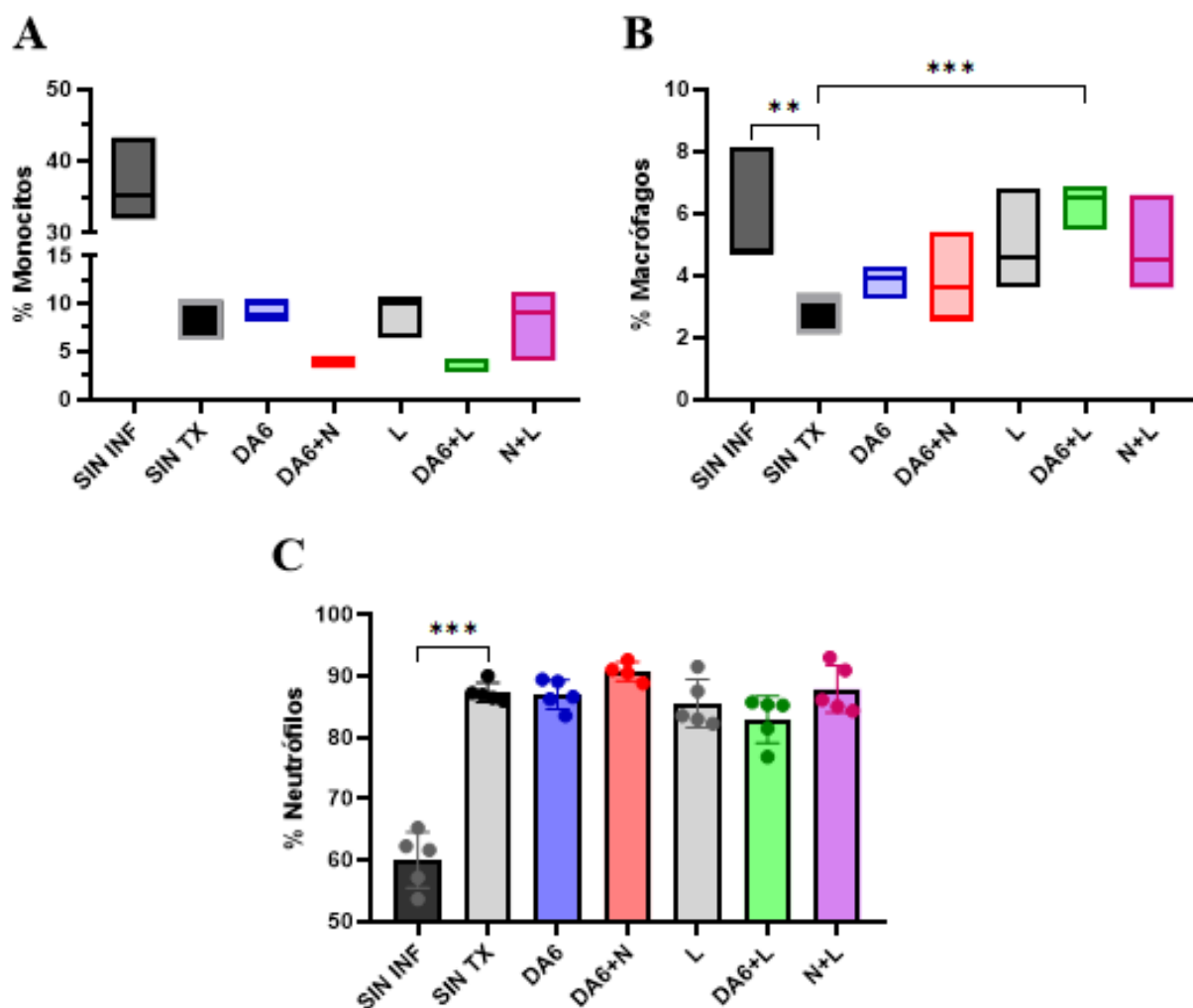


Figura 11. Porcentaje de macrófagos, monocitos y neutrófilos en bazo. La administración del tratamiento combinado del péptido antimicrobiano DA6 y el antibiótico Linezolid modificó el porcentaje de macrófagos presente en bazo. A y B) Kruskal-Wallis test, comparación múltiple de Dunn. C) ANOVA de una vía, comparación múltiple de Dunnett. n=4-5 **p<0.01 ***p<0.01.

7.6 Identificación de los efectos inmunomoduladores de los péptidos antimicrobianos en sangre periférica venosa.

Se analizaron las poblaciones de monocitos, neutrófilos y Linfocitos T CD4+ y CD8+ en sangre periférica venosa con la finalidad de observar si los péptidos antimicrobianos tenían la capacidad de modificar estas poblaciones celulares en diferentes tejidos.

Al analizar la población de Linfocitos T CD4+ y CD8+ se encontró que no había diferencia alguna entre los porcentajes de los ratones sin infección y los ratones infectados y no tratados. Este mismo patrón de comportamiento se observó al comparar el porcentaje de Linfocitos T CD4+ de los ratones infectados y tratados contra los ratones infectados y sin tratamiento. Aunque se observó cierta tendencia a aumentar esta población celular al administrar el péptido “DA6” solo o en combinación con el péptido “N” (“DA6+N”), estos cambios no arrojaron significancia estadística.

En la población de Linfocitos T CD8+, solo la administración del antibiótico Linezolid modificó significativamente esta población celular, ya que se observó que disminuía la proporción de estas células al comparar con los ratones infectados sin tratamiento. El resto de los tratamientos administrados no ocasiono modificación en los porcentajes de estos linfocitos en particular.

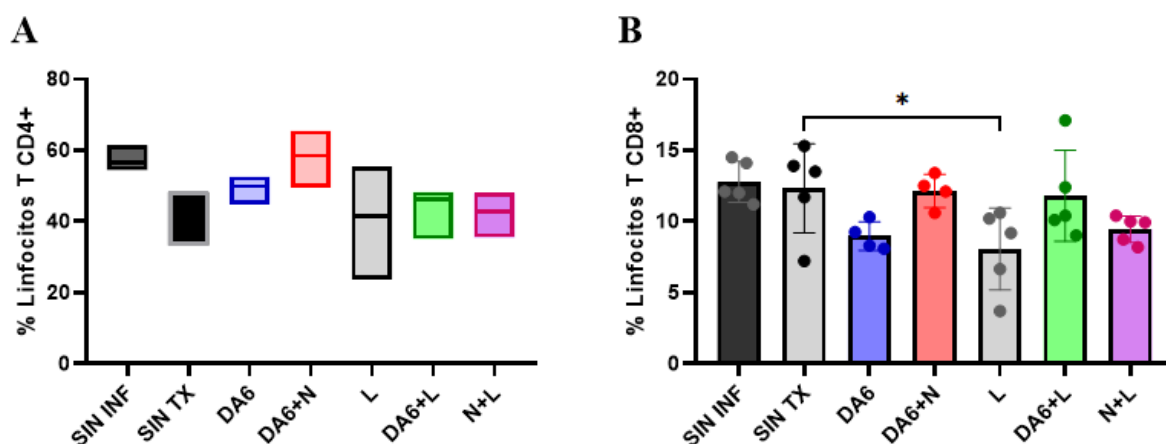


Figura 12. Porcentaje de Linfocitos T CD4+ y CD8+ en sangre periférica venosa. La administración del antibiótico modificó el porcentaje de Linfocitos T CD8+. A) Kruskal-Wallis test, comparación múltiple de Dunn. B) ANOVA de una vía, comparación múltiple de Dunnett. n=4-5 *p<0.05.

En las células mieloides analizadas en este tejido, se encontró que los porcentajes de monocitos y neutrófilos de los ratones sin infección y los ratones infectados y no tratados eran muy similares entre sí, por lo que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En lo que respecta a los grupos de ratones infectados y tratados, se encontró que solo los tratamientos que involucraban al péptido “DA6”, es decir, la administración

de “DA6” solo o en combinación, ya sea con el péptido “N” (“DA6+N”) o con el antibiótico Linezolid (“DA6+L”) disminuían considerablemente los porcentajes de monocitos en comparación con los ratones infectados y sin tratamiento.

Por otro lado, en la población de neutrófilos se observó un comportamiento opuesto al encontrado en los monocitos. Donde la mayoría de los tratamientos administrados, es decir, tanto la administración del péptido “DA6” solo, como en combinación con el péptido “N” (“DA6+N”) y los tratamientos combinados de los péptidos con el antibiótico (“DA6+L” y “N+L”) ocasionaron el aumento en el porcentaje de estas células. El único tratamiento que no ocasiono la modificación de esta estirpe mieloide fue la administración del antibiótico Linezolid.

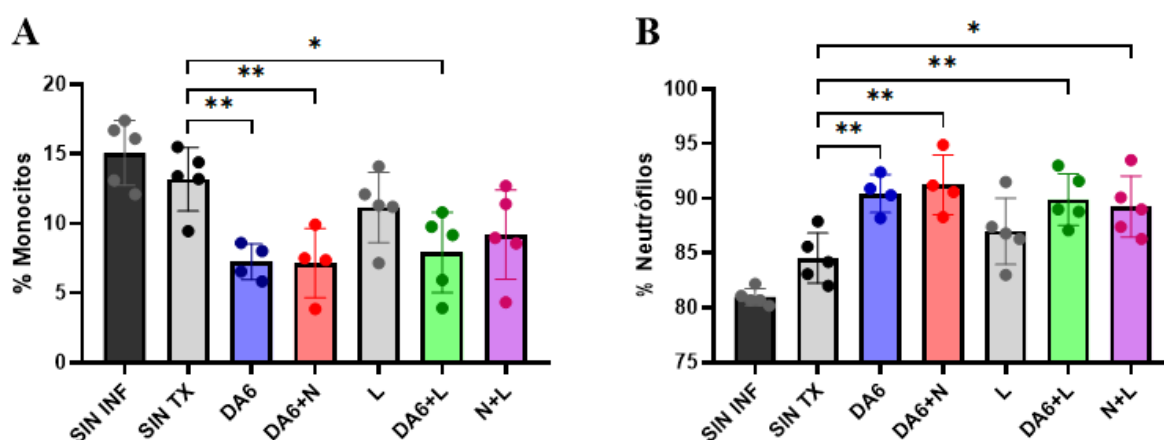


Figura 13. Porcentaje de monocitos y neutrófilos en sangre periférica venosa. La administración de ciertos tratamientos modificó los porcentajes de monocitos y neutrófilos. A y B) Kruskal-Wallis test, comparación múltiple de Dunn. C) ANOVA de una vía, comparación múltiple de Dunnet. n=4-5 *p<0.05 **p<0.01.

7.7 Identificación de los efectos inmunomoduladores de los péptidos antimicrobianos en citocinas presentes en suero.

Para identificar si los péptidos antimicrobianos ejercían efectos inmunomoduladores de manera sistémica, aparte de analizar poblaciones leucocitarias, se decidió analizar los niveles de citocinas presentes en suero una vez finalizados los tratamientos.

Se analizaron un total de 13 citocinas mediante multiplex, las cuales se incluyeron las siguientes citocinas pro-inflamatorias IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12p70, TNF- α , IFN- γ ,

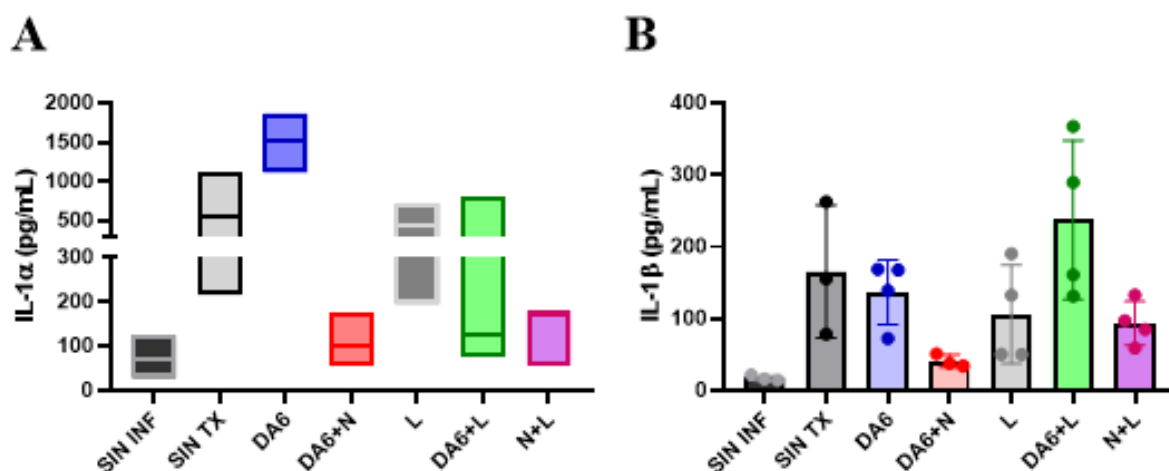
IFN- β , IL-17, IL-23, y IL-27, así como las quimiocinas GM-CSF y MCP-1 y la citocina anti-inflamatoria IL-10.

Entre las citocinas pro-inflamatorias consideradas de respuesta aguda, observamos que en el grupo infectado sin tratamiento existía un aumento de IL-1 α , IL-1 β e IL-6 en comparación con el grupo sin infección, sin embargo, estos resultados no eran estadísticamente significativos.

En los niveles de IL-1 α encontramos que al grupo que se le administró el péptido “DA6” tenía una tendencia a aumentar esta citocina. Por otro lado, un comportamiento contrario se observó en los grupos que se les administró los péptidos “DA6” y “N” en conjunto, así como la administración del tratamiento combinado del péptido “N” y el antibiótico Linezolid (“N+L”).

En cuanto a los niveles de IL-1 β , se encontró que solo el tratamiento de los péptidos “DA6” y “N” en conjunto ocasionaba una disminución en el nivel de esta citocina. Mientras que los grupos restantes no modificaron los niveles séricos de IL-1 β .

Los niveles de IL-6 solo aumentaron ligeramente cuando se administró el péptido “DA6”. En la administración de los tratamientos restantes los niveles de esta citocina se mantuvieron sin cambio al comparar con el grupo de ratones infectados sin tratamiento.



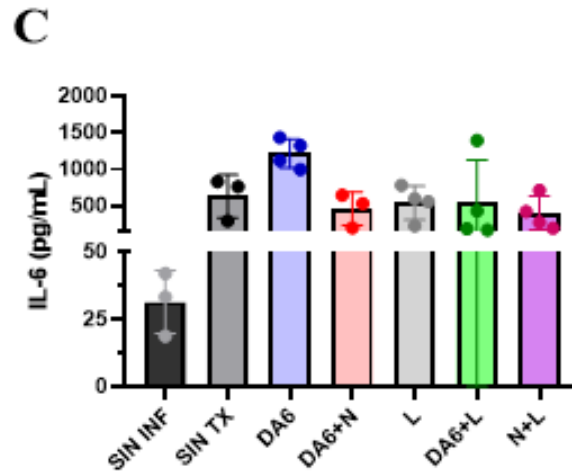


Figura 14. Niveles séricos de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 α , IL-1 β e IL-6. La administración de los diferentes tratamientos no modificó los niveles en suero de estas citocinas de fase aguda. A) Kruskal-Wallis test, comparación múltiple de Dunn. B y C) ANOVA de una vía, comparación múltiple de Dunnett. n=3-4 ns: p>0.05.

En los niveles de TNF- α se encontró que existía un aumento de esta citocina en el grupo de ratones infectados y no tratados al comparar con el grupo de ratones sin infección.

Por otra parte, al comparar entre el grupo de ratones sin tratamiento y los grupos a los que se les administró los diferentes tratamientos, se observó una tendencia de los niveles de esta citocina pro-inflamatoria a disminuir.

En cuanto a la citocina IL-12p70, se observó un aumento de esta en el grupo de ratones infectados sin tratamiento al comparar con el grupo sin infección. Un comportamiento contrario lo ocasiono la administración de los péptidos “DA6” y “N” en conjunto, donde se encontró una disminución de esta citocina al comparar con el grupo sin tratamiento. La administración de los tratamientos restantes no modifico los niveles de la citocina IL-12p70.

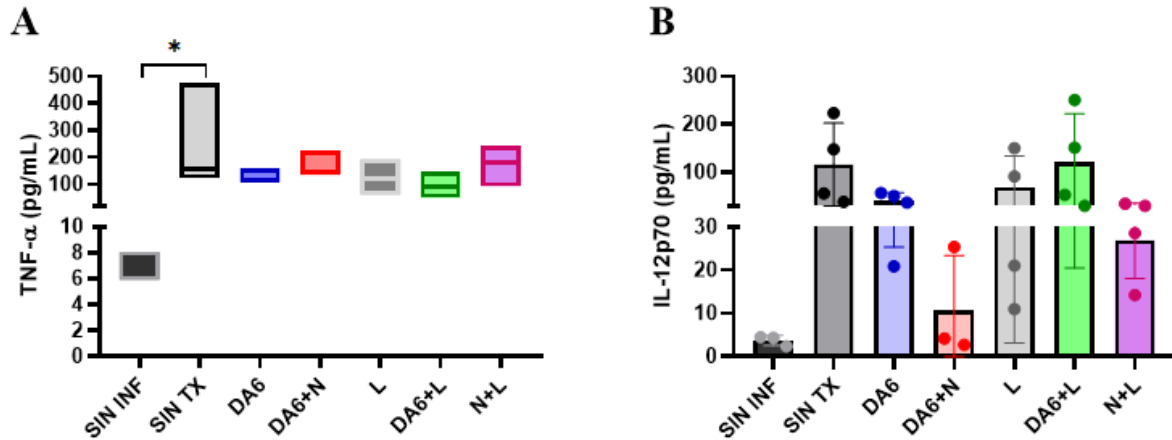


Figura 15. Niveles séricos de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-12p70. La administración de los diferentes tratamientos no modificó los niveles en suero de estas citocinas. A) Kruskal-Wallis test, comparación múltiple de Dunn. B) ANOVA de una vía, comparación múltiple de Dunnett. n=3-4 ns: $p>0.05$ * $p<0.05$.

En los niveles de IFN- β e IL-27 se observó un comportamiento similar a las demás citocinas descritas anteriormente, donde los ratones infectados y no tratados presentaron niveles más altos que los ratones sin infección.

Al comparar entre el grupo infectado y sin tratamiento, y los grupos de ratones infectados y que se les administró diferentes tratamientos se encontró que al grupo que se le administró los péptidos “DA6” y “N” en conjunto tenía una tendencia a disminuir el nivel de IFN- β . Por otro lado, la administración del péptido “DA6” en combinación con Linezolid disminuía el nivel de esta citocina. Los demás tratamientos no ocasionaron modificación alguna.

Mientras que en los niveles de IL-27 se encontró que la administración de los diferentes tratamientos no ocasionó que estos se modificaran al comparar con los ratones infectados y no tratados. Posiblemente debido a la dispersión observada en este último grupo.

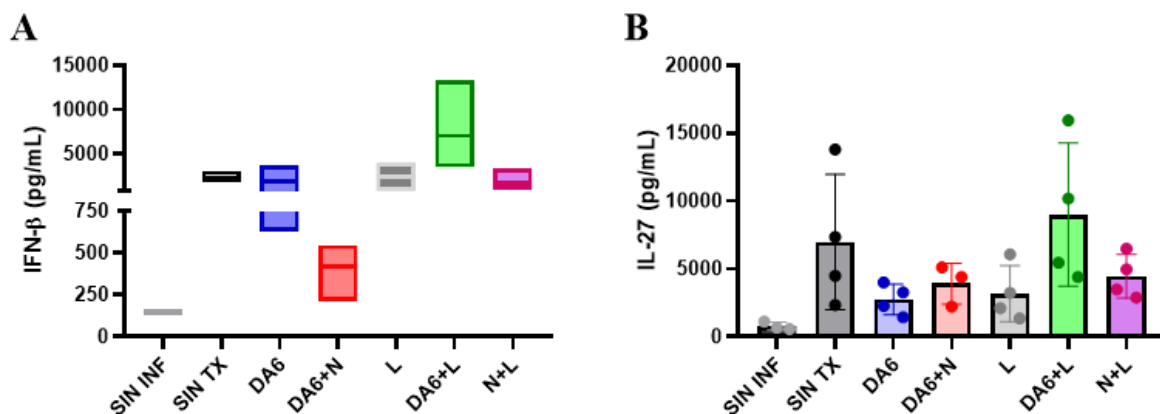


Figura 16. Niveles séricos de las citocinas pro-inflamatorias IFN- β e IL-27. La administración de los diferentes tratamientos no modificó los niveles en suero de estas citocinas. A) Kruskal-Wallis test, comparación múltiple de Dunn. B) ANOVA de una vía, comparación múltiple de Dunnet. n=3-4 ns: p>0.05.

En los niveles de IFN- γ , IL-23 e IL-17A se observó un aumento de estas citocinas en el grupo infectado sin tratamiento en comparación con los ratones sin infección. Este es el mismo patrón de comportamiento que se encontró en las citocinas descritas anteriormente.

En cuanto a la citocina IFN- γ se observó que todos los tratamientos administrados ocasionaron una disminución en el nivel de esta citocina, al comparar con el grupo infectado sin tratamiento. Comportamiento similar al encontrado en los niveles de la citocina IL-23; en esta citocina en particular, solo la administración del péptido “N” en combinación con Linezolid no ocasiono modificación alguna. Los tratamientos restantes disminuyeron considerablemente el nivel de IL-23.

Al analizar el nivel sérico de IL-17A se pudo observar que la administración de los diferentes tratamientos no ocasionó modificación alguna en esta citocina en particular.

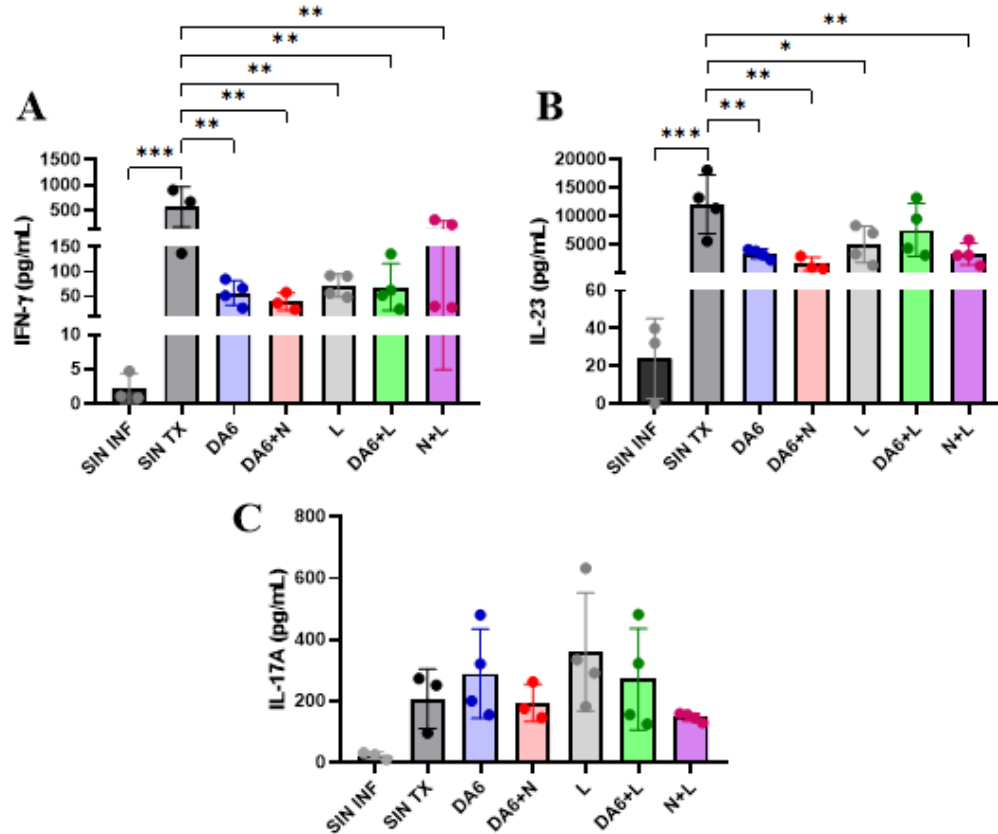


Figura 17. Niveles séricos de las citocinas pro-inflamatorias IFN- γ , IL-23 e IL-17A. La administración de los diferentes tratamientos modificó los niveles en suero de las citocinas IFN- γ e IL-23. A, B y C) ANOVA de una vía, comparación múltiple de Dunnet. n=3-4 ns: $p > 0.05$ * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

Al igual que con otras citocinas analizadas en este trabajo, la infección presente en los ratones ocasionó el aumento de las quimiocinas MCP-1 y GM-CSF.

Por otra parte, la administración de los diferentes tratamientos no ocasiono cambios en el nivel sérico de MCP-1 al comparar con el grupo de ratones infectados sin tratamiento. Sin embargo, al examinar la quimiocina GM-CSF, se encontró que la administración de los péptidos “DA6” y “N” en conjunto tendía a disminuir el nivel sérico de esta. Tendencia contraria a la observada con la administración del péptido “N” en combinación con Linezolid, donde el nivel de GM-CSF aumentó ligeramente. Los tratamientos restantes no modificaron el nivel de esta quimiocina.

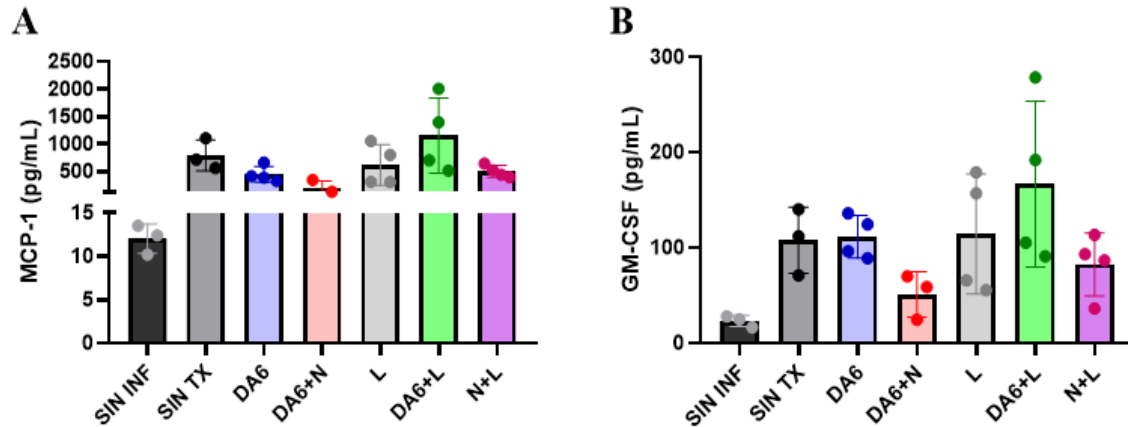


Figura 18. Niveles séricos de las quimiocinas MCP-1 y GM-CSF. La administración de los diferentes tratamientos no modificó los niveles en suero de las quimiocinas. A y B) ANOVA de una vía, comparación múltiple de Dunnet. n=3-4 ns: $p>0.05$.

Por último, se analizó el nivel de la citocina anti-inflamatoria IL-10, donde se observó el mismo patrón repetitivo; donde los ratones infectados y sin tratamiento presentaban un nivel aumentado de esta citocina en comparación con los ratones sin infección.

En esta citocina, solo la administración de los péptidos “DA6” y “N” en conjunto ocasionaron la disminución en el nivel sérico de IL-10. El resto de los tratamientos administrados no modificó el comportamiento de esta citocina al comparar con el grupo sin tratamiento.

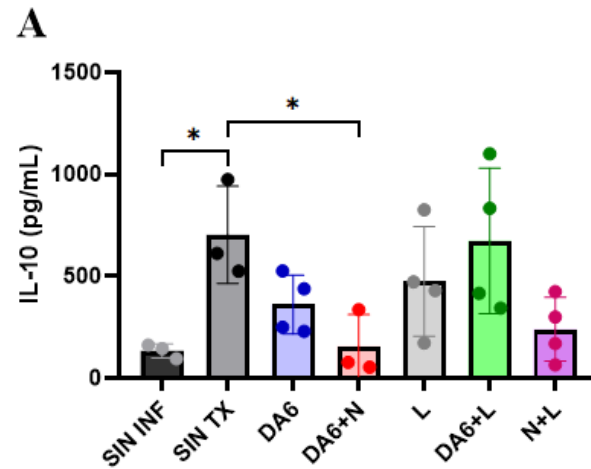


Figura 19. Nivel sérico de la citocina anti-inflamatoria IL-10. La administración del tratamiento en conjunto de los péptidos “DA6” y “N” modificó el nivel en suero de esta citocina. A) ANOVA de una vía, comparación múltiple de Dunnet. n=3-4 ns: $p>0.05$ * $p<0.05$.

CAPITULO 8

Discusión

Con el aumento de resistencia antibacteriana a los antibióticos convencionales, han aumentado la morbilidad y la mortalidad por infecciones bacterianas. Además, la Organización Mundial de la Salud (OMS) afirma que las opciones terapéuticas para tratar las infecciones son cada vez más limitadas, lo que hace urgente el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas (54).

Actualmente, los péptidos antimicrobianos se encuentran entre las moléculas más estudiadas, con una intensa investigación clínica y no clínica para evaluarlos como posibles antibióticos de próxima generación (28). En las últimas décadas, se han purificado de la piel de rana más de 300 péptidos bioactivos con diversas y notables propiedades farmacológicas, lo que representa una rica fuente de compuestos terapéuticos (27). Muchos de estos péptidos antimicrobianos muestran actividad antimicrobiana, como la capacidad de modular las respuestas del sistema inmunitario *in vitro* (55). Sin embargo, cuando se prueban en modelos preclínicos, no son eficaces para eliminar o controlar infecciones porque pierden su actividad al ser degradados por diversas enzimas presentes en el organismo (49,56).

Es por esto, que en este trabajo se propuso que los péptidos antimicrobianos DMS-DA6 y DRS-DA2N son una alternativa terapéutica prometedora y más segura en comparación con los antibióticos utilizados comúnmente como tratamiento para el actinomicetoma. Para comprobar esta hipótesis se evaluó la actividad antibacteriana y los posibles efectos inmunomoduladores de los péptidos DMS-DA6 y DRS-DA2N en el modelo del actinomicetoma por *N. brasiliensis*.

Y para comprender mejor la inmunopatología de esta infección se decidió analizar las poblaciones de monocitos, macrófagos, neutrófilos y Linfocitos T CD4+ y CD8+, así como los niveles de diversas citocinas pro-inflamatorias en ratones sanos y en ratones infectados por *N. brasiliensis*, enfocándonos en el estudio de la fase crónica de esta infección.

Histológicamente, se ha demostrado que en el actinomicetoma por *N. brasiliensis* existen granulomas, rodeados de un gran infiltrado inflamatorio con abundantes neutrófilos y varios macrófagos rodeando el grano bacteriano (12). En este trabajo, confirmamos una vez más que, aunque la infección es de naturaleza crónica, coexiste con una infección aguda activa, ya que, mediante análisis por citometría de flujo, pudimos confirmar que la mayoría de las células presentes en la almohadilla infectada eran neutrófilos, lo que supone un gran aumento en comparación con los ratones no infectados. Aunque podría pensarse que la presencia abundante de neutrófilos es beneficiosa para limitar la infección causada por bacterias debido a su potente actividad antimicrobiana, se ha informado de que en infecciones crónicas como las causadas por *Mycobacterium tuberculosis*, una elevada proporción de estas células presentes en el lugar de la infección es perjudicial (57). Varios estudios han informado de que los neutrófilos pueden actuar como reservorio de *M. tuberculosis*, así como de otros microorganismos patógenos (58,59), y ayudar a evadir diversos mecanismos del sistema inmunitario que intentan eliminar las bacterias; también se ha observado que la neutrofilia se asocia a un estado inflamatorio descontrolado y a una deficiente capacidad bactericida de los neutrófilos, lo que se ha relacionado con un mal pronóstico de la infección (60,61). Por lo tanto, dado que *N. brasiliensis* es una bacteria intracelular causante de infección crónica, es probable que se esté explotando el mismo mecanismo, ya que, aunque observamos abundantes neutrófilos en el lugar de la lesión, no se produce una reducción o resolución de la infección.

Así mismo, observamos que el porcentaje de macrófagos aumentaba significativamente en los ratones infectados, lo que demuestra que estas células estaban siendo indudablemente reclutadas al lugar de la infección. Esto concuerda con lo observado en otros estudios de infección crónica, en los que se ha observado un reclutamiento activo de monocitos derivados de la médula ósea o de la sangre al lugar de la infección (62,63). Sin embargo, no se sabe con certeza si la función de estos macrófagos es protectora o perjudicial, ya que se ha demostrado que, en infecciones crónicas, como las causadas por *Mycobacterium tuberculosis*, estas

células actúan como reservorio de la bacteria, proporcionando un nicho para su crecimiento y ayudando a propagar la infección a otras células (64,65).

En cuanto a la población de linfocitos, se puede observar que la presencia de estos es muy baja en comparación con los neutrófilos; estos resultados concuerdan con informes previos en este modelo donde se ha observado que la proporción de linfocitos T en el lugar de la infección es inferior al 1% (18). Además, se puede observar que la cinética de los linfocitos CD4+ es diferente a la de los linfocitos CD8+, ya que mientras que estos últimos permanecen sin cambios aparentes entre los ratones sanos y los infectados sin tratamiento, se puede observar que hay una disminución en el porcentaje de linfocitos T CD4+ cuando los ratones están infectados. Esta disminución podría deberse a que los linfocitos que ya se encuentran en el lugar de la infección presentan algunos defectos funcionales, ya que se ha descrito que la estimulación antigénica crónica puede reducir el número de linfocitos en infecciones crónicas (66,67). Sin embargo, es necesario seguir investigando la razón por la que sólo se ve afectada la población de células CD4+.

Por otro lado, aunque se sabe que *N. brasiliensis* causa una infección localizada, este trabajo demuestra que la infección tiene repercusiones sistémicas, ya que, al analizar las poblaciones leucocitarias en bazo y sangre, se observa que hay modificaciones en las poblaciones de monocitos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos al comparar ratones sanos e infectados. Entre los cambios observados se encuentra una disminución de los porcentajes de monocitos y macrófagos en el bazo de los ratones con actinomicetoma; Esto podría estar relacionado con el aumento observado de macrófagos en la almohadilla infectada, ya que se ha demostrado que el bazo es un reservorio de monocitos extramedulares y que, en determinadas afecciones crónicas y agudas, los monocitos del bazo son atraídos a sitios de inflamación y, dependiendo del medio en el que se encuentren, pueden participar en la reparación de heridas o exacerbar la patología de la enfermedad en cuestión (68–70).

Además, la presencia de macrófagos en el lugar de la lesión ya se ha demostrado ampliamente en el modelo experimental de actinomicetoma (11,71); y se ha

propuesto que estas células pueden ser un factor clave en la patogénesis de la infección (72,73). Además, nuestros resultados concuerdan con otro estudio que demuestra que la infección crónica con la bacteria intracelular *Brucella* produce cambios en el bazo, donde se observa una disminución de la población de macrófagos (74). Además, si analizamos la población de monocitos en sangre, podemos observar que no se observan cambios significativos entre los ratones sanos y los infectados. Aunque se ha descrito una tendencia general al aumento del número de estas células en infecciones crónicas (75,76), en este caso concreto es necesario utilizar marcadores más específicos para diferenciar entre fenotipos de monocitos y observar cambios perceptibles. Dado que en otros estudios se ha observado que, al analizar la población de monocitos en general, no existen diferencias entre los controles sanos y los sujetos que presentan la infección, sino que, hasta que se identifican los distintos fenotipos de estas células, se observan cambios muy notables (77,78).

Por otra parte, se observó un aumento del porcentaje de neutrófilos en el bazo y en la sangre. El aumento en bazo ya se ha descrito en condiciones de estrés, infección o cáncer, el bazo sirve como sitio de hematopoyesis extracelular, donde se estimula la producción de precursores mieloides que dan lugar a monocitos y neutrófilos que son capaces de migrar al sitio de infección o, en algunos casos, al tumor (79). Del mismo modo, se ha descrito ampliamente un aumento de los neutrófilos en sangre en la infección por *M. tuberculosis* (80,81). Sin embargo, el papel de los neutrófilos en la inflamación crónica sigue siendo controvertido, ya que algunos autores sugieren que el aumento de estas células se debe probablemente a una gran demanda de las mismas para eliminar la patología existente, mientras que otros sugieren que estas células pueden contribuir a promoverla (82,83).

En cuanto a la población de linfocitos en bazo, no observamos diferencias en las proporciones de células CD4+ y CD8+ entre los ratones sanos y los infectados. Este comportamiento puede deberse a que *N. brasiliensis* no tiene la capacidad de transporte al bazo y, por tanto, no promueve la proliferación de linfocitos T, ya que se ha demostrado que la activación y proliferación de estas células en este órgano

se debe a patógenos capaces de causar infección sistémica que llegan al bazo a través de la sangre (84,85); sin embargo, son necesarios más estudios para verificar esta teoría. En la sangre, seguimos sin observar cambios en los linfocitos T CD8+; sin embargo, hay una disminución de los linfocitos T CD4+ en los ratones infectados. Este comportamiento es similar al descrito en otras infecciones crónicas (86,87), lo que sugiere que la infección provoca cambios en la homeostasis linfocitaria.

Por otro lado, en lo que se refiere a los niveles séricos de citocinas analizados en este trabajo. Se puede observar que la mayoría de las citocinas elevan sus niveles cuando está presente la infección sin tratamiento. Sin embargo, muchos de estos resultados no tienen significancia estadística, probablemente debido al número tan pequeña de muestra que se analizó.

No obstante, las citocinas TNF- α , IFN γ -, IL-23 e IL-10 presentan un nivel aumentado significativo. Por lo que se puede deducir que sin duda está presente un proceso inflamatorio. Estos datos están en concordancia con estudios previos donde se demuestra un incremento de células productoras de TNF- α , IL-6 e IL-10 en el sitio de la lesión; citocinas que se han asociado a la presencia de una mayor carga bacteriana y a facilitar la formación de granulomas en la infección por *M. tuberculosis* (88). Así mismo, altos niveles de las citocinas pro-inflamatorias IL-23 e IFN- γ podrían estar relacionados, ya que se ha observado que la IL-23 es capaz de inducir la producción de IFN- γ (89). Por lo tanto, el aumento tanto de IL-23 como de IFN- γ podría explicarse de este modo.

Una vez que se conoció el comportamiento de poblaciones de leucocitos, así como de los niveles de las citocinas mencionadas anteriormente en los ratones que presentaban la infección, se procedió a analizar estos mismos parámetros en ratones infectados a los que se les administraron los diferentes tratamientos. Esto con el fin de detectar si los péptidos antimicrobianos por si solos o en terapia combinada con el antibiótico Linezolid tenían la capacidad de modular la respuesta inmune para controlar o erradicar la infección presente.

Las dos dermaseptinas que se han utilizado en este trabajo: DMS-DA6 y DRS-DA2N, fueron extraídas de la rana arborícola mexicana *Pachymedusa dacnicolor*. Y

actualmente han demostrado tener una excelente actividad antimicrobiana frente a bacterias gram-positivas, especialmente DMS-DA6 (50); además, DRS-DA2N puede inducir selectivamente la muerte de células inmunitarias y regular así la reserva de leucocitos en el lugar de aplicación del péptido, lo que se traduce en una reducción de la inflamación (51).

Uno de los principales hallazgos de este trabajo es que los péptidos DMS-DA6 y DRS-DA2N, administrados *in vivo*, muestran un gran potencial como alternativa terapéutica en la infección crónica por *N. brasiliensis*. Aunque las concentraciones mínimas inhibitoria y bactericida (CMI y CBM) de estos péptidos antimicrobianos se consideran elevadas, como se demostró en el estudio *in vitro* (500 μ M para DMS-DA6 y 1 mM para DRS-DA2N), se demuestra que la actividad antibacteriana de estos péptidos se mantiene cuando se administran *in vivo*, ya que se produce una reducción de unidades formadoras de colonias (CFU) en el cojinete plantar infectado de los ratones a los que se administró el tratamiento. Además, se demuestra que la administración de estos péptidos es segura, ya que los ratones no muestran signos de toxicidad aparente, como demuestran las escasas variaciones en el peso de los ratones y la supervivencia del 100% de los ratones utilizados. Además, la administración de DMS-DA6 solo o en combinación con DRS-DA2N ayuda a reducir el volumen del cojinete plantar infectado, lo que indica que de alguna manera se está controlando la infección, ya que en los ratones no tratados el comportamiento normal es un aumento del volumen de la zona afectada hasta provocar la pérdida de la función.

Este comportamiento concuerda con otros autores, que han demostrado que péptidos antimicrobianos que carecen por completo de actividad antibacteriana *in vitro*, al momento de probar estos mismos péptidos *in vivo*, sí existe una disminución en la carga bacteriana, probablemente a sus efectos inmunomoduladores (90,91).

Es interesante destacar que, aunque el tratamiento con el péptido DMS-DA6 junto con el péptido DRS-DA2N no reduce el volumen del cojinete plantar infectado, tampoco lo aumenta como en los ratones infectados y no tratados; además se observa que la combinación de estos dos péptidos reduce significativamente la

carga bacteriana en la extremidad infectada. Este comportamiento puede deberse a que la concentración de los péptidos utilizada es insuficiente para controlar eficazmente la infección (5 mg/kg), ya que cuando se administra solamente el péptido DMS-DA6 a una concentración de 12.5 mg/kg, la reducción del volumen del cojinete plantar infectado es notable.

Por otra parte, en este trabajo se administraron combinaciones de péptido con el antibiótico Linezolid. Ya que una de las estrategias comúnmente utilizadas para mejorar la actividad antimicrobiana de los fármacos es la terapia combinada, ya que permite el uso de dosis más bajas, aumentando los efectos beneficiosos y, en el mejor de los casos, provocando un efecto sinérgico contra el patógeno a eliminar (92). Por este motivo, en este trabajo decidimos analizar los efectos de la combinación de Linezolid, un antibiótico común utilizado para tratar el actinomicetoma, con el péptido DMS-DA6, además de comparar los efectos de la monoterapia con el antibiótico y el péptido.

Los resultados con la monoterapia con Linezolid demuestra que es capaz de reducir la carga bacteriana y la inflamación en el cojinete plantar infectado. Sin embargo, los resultados obtenidos con la monoterapia con péptidos y la terapia combinada son más alentadores. Ya que puede observarse que, al combinar estos dos compuestos, hay una reducción más pronunciada de la inflamación y de las unidades formadoras de colonias (CFU) observada en la terapia combinada en comparación con la monoterapia con Linezolid. Cabe destacar que las dosis de DMS-DA6 empleadas en monoterapia son inferiores a las utilizadas en monoterapia con Linezolid. Además, mientras que el péptido se administra sólo dos veces por semana, el antibiótico se administra cada 12 horas, con lo que se obtienen resultados comparables en cuanto a reducción de la inflamación y disminución de la carga bacteriana.

Por otro lado, se ha demostrado que muchos de los péptidos aislados de diferentes especies de ranas tienen la capacidad de regular los procesos inflamatorios, ya sea induciendo o inhibiendo la secreción de citocinas o promoviendo el reclutamiento de

células del sistema inmunitario (93–95). Por esta razón se evaluó si los péptidos DMS-DA6 y DRS-DA2N poseen efectos inmunomoduladores *in vivo*.

En el lugar de la lesión, se observa que tanto la monoterapia con el péptido “DA6”, así como la administración combinada de los péptidos “DA6” y “N” y en conjunto con Linezolid tienden a aumentar la población de células CD4+ y CD8+. Este aumento, puede ser un indicio de que estas células podrían estar ayudando a eliminar la bacteria presente, ya que se sabe que en infecciones bacterianas intracelulares las células CD4+ Th1 y CD8+ son necesarias para erradicar este tipo de infecciones.

En las células mieloides analizadas en el sitio de la lesión se observó una tendencia a aumentar el porcentaje de macrófagos inducida por la administración del péptido “DA6” solo y en combinación con el péptido “N”; por lo que se podría inferir que los péptidos son los responsables de estos cambios. Ya que en los tratamientos restantes no se observa esta tendencia. Estos resultados concordarían con otros trabajos, donde se ha demostrado que ciertas dermaseptinas tienen la capacidad de influir en la quimiotaxis de otras células (96). Otra estirpe mioide analizado fueron los neutrófilos, sin embargo, en esta población celular la administración de los diferentes tratamientos no modificó el porcentaje de estos.

Además de modificar los leucocitos localmente en el lugar de la infección, este trabajo también demuestra que los péptidos DMS-DA6 y DRS-DA2N puede hacerlo sistémicamente en el bazo y la sangre de los ratones tratados.

En el bazo la disminución de Linfocitos T CD4+ y CD8+ se puede atribuir a la administración de los péptidos en cuestión. Ya que el tratamiento con Linezolid no ocasiona cambio alguno en estas poblaciones celulares. Este comportamiento nos indica que los péptidos DMS-DA6 y DRS-DA2N pueden tener diferentes efectos dependiendo de la célula en estudio. Ya que se observa que puede aumentar cierto tipo celular mientras disminuye otro. Por lo que podría ser un indicio de que pueden existir interacciones de los péptidos con componentes del sistema inmunitario para inducir una afluencia de determinadas células inmunitarias mientras disminuye la proporción de otras, este mismo comportamiento se ha observado con otros

péptidos (36,97); no obstante, se necesitan más estudios para comprobar esta teoría.

En el bazo, el incremento en el porcentaje de macrófagos debido a la administración del péptido “DA6” en combinación con Linezolid, puede ser un efecto ocasionado por la administración de estas dos moléculas. Ya que la monoterapia con el péptido o el antibiótico no modifica el porcentaje de estas células. Estos resultados concuerdan con otros trabajos donde se ha demostrado que la administración por si sola de antibióticos o péptidos no ocasiona modificaciones en los parámetros evaluados, pero al combinar estas dos moléculas se observa un efecto diferente (98).

En cuanto a los cambios en los leucocitos sanguíneos, observamos que solo la monoterapia con Linezolid provocó una disminución de las células CD8+ en este tejido. Este efecto observado podría estar relacionado con la disminución de la carga bacteriana; puesto que se ha demostrado que en las infecciones causadas por bacterias intracelulares, las células CD8+ son indispensables para controlar las infecciones de este tipo (99), por lo tanto, al haber menos bacterias, es muy probable que también haya una menor demanda de este tipo de células.

En lo que respecta a las células mieloides que se analizaron, la disminución en el porcentaje de monocitos debido a la administración del péptido “DA6” solo o en combinación con el péptido “N” o con Linezolid, es un comportamiento atribuible al péptido “DA6”. Ya que solo los tratamientos que involucraban a este resultaron en modificaciones en el porcentaje de monocitos. Nuestros hallazgos coinciden con el resultado de múltiples investigaciones in vivo que demuestran que la administración de diferentes AMPs ejerce un efecto directo sobre los monocitos y las quimiocinas responsables de su reclutamiento (36,100). Además, en infecciones crónicas, como las causadas por *M. tuberculosis*, la elevada producción de monocitos se asocia con gravedad (75,76); por lo tanto, en la infección por *N. brasiliensis*, la disminución de monocitos podría asociarse con una disminución del proceso inflamatorio y, por lo tanto, con un buen pronóstico.

Por otro lado, el aumento del porcentaje de neutrófilos cuando se administran los péptidos ya sea solos o en combinación con Linezolid, podría ser un efecto causado por el péptido en cuestión, ya que la monoterapia con el antibiótico no ocasiona modificación alguna en esta población celular. Lo que sugiere que el DMS-DA6 podría promover la producción de neutrófilos y contribuir así a eliminar la patología presente.

Por otra parte, la disminución del nivel sérico de la citocina anti-inflamatorias IL-10 pueden atribuirse a los péptidos DMS-DA6 y DRS-DA2N, ya que al administrar Linezolid en monoterapia, esta citocina no se modifica. Caso contrario con las citocinas pro-inflamatorias IFN- γ e IL-23, donde todos los tratamientos, incluyendo la monoterapia con Linezolid modifica los niveles séricos de estas citocinas. Estos cambios que podrían estar relacionados con la disminución de la carga bacteriana. Es de resaltar, que los cambios en los niveles de estas citocinas cuando se aplica la terapia combinada del péptido y el antibiótico podrían indicar que existe una interacción entre estos compuestos que ayudan a regular el proceso inflamatorio presente.

Aunque es probable que muchos de nuestros resultados puedan atribuirse a los efectos inmunomoduladores de los péptidos DMS-DA6 y DRS-DA2N, no puede excluirse la posibilidad de que este efecto sea una combinación del efecto antibacteriano y los efectos inmunomoduladores.

Nuestros hallazgos sugieren que los péptidos DMS-DA6 y DRS-DA2N son un tratamiento más eficaz que el Linezolid, ya que consigue resultados comparables utilizando una dosis menor. Además, se demostró que los tratamientos con los péptidos inducen cambios en las poblaciones de leucocitos y en los niveles séricos de citocinas, lo que sugiere la posibilidad de que estos péptidos tienen efectos inmunomoduladores. En conjunto, estos hallazgos sugieren que los péptidos antimicrobianos DMS-DA6 y DRS-DA2N tiene el potencial de funcionar como una opción terapéutica eficaz para el manejo de la infección por actinomicetoma causada por *N. brasiliensis*.

CAPÍTULO 9

Conclusión

Los péptidos antimicrobianos DMS-DA6 y DRS-DA2N tienen actividad inmunomoduladora y microbicida en el actinomicetoma experimental por *N. brasiliensis*.

CAPÍTULO 10

Perspectivas

- Identificar las células con las que interactúan los péptidos antibacterianos DA6 y N.
- Analizar el fenotipo y el estado de activación de los leucocitos en tejido infectado y sistémicamente.
- Identificar los receptores celulares a los que se unen los péptidos antibacterianos.
- Identificar las vías de señalización involucradas en la inmunomodulación de los péptidos antimicrobianos.

Bibliografía

1. Agarwal P, Jagati A, Rathod SP, Kalra K, Patel S, Chaudhari M. Clinical Features of Mycetoma and the Appropriate Treatment Options. *Res Rep Trop Med*. 2021 Jul;Volume 12:173–9. doi:10.2147/RRTM.S282266
2. Welsh O, Vera-Cabrera L, Salinas-Carmona MC. Mycetoma. *Clin Dermatol*. 2007 Mar;25(2):195–202. doi:10.1016/j.clindermatol.2006.05.011
3. Corti E, Villafañe F. Review Nocardiosis: a review. 8.
4. Zijlstra EE, Sande WWJ van de, Welsh O, Mahgoub ES, Goodfellow M, Fahal AH. Mycetoma: a unique neglected tropical disease. *Lancet Infect Dis*. 2016 Jan 1;16(1):100–12. doi:10.1016/S1473-3099(15)00359-X PubMed PMID: 26738840.
5. Welsh O, Salinas-Carmona MC, la Garza JACD, Rodriguez-Escamilla IM, Sanchez-Meza E. Current Treatment of Mycetoma. *Curr Treat Options Infect Dis*. 2018 Sep;10(3):389–96. doi:10.1007/s40506-018-0171-y
6. Welsh O. Mycetoma.: Current Concepts in Treatment. *Int J Dermatol*. 1991 Jun;30(6):387–98. doi:10.1111/j.1365-4362.1991.tb03892.x
7. Murray PR, American Society for Microbiology. *Manual of clinical microbiology*. Washington, D.C.: ASM Press; 1999.
8. Conville PS, Brown-Elliott BA, Smith T, Zelazny AM. The Complexities of *Nocardia* Taxonomy and Identification. Kraft CS, editor. *J Clin Microbiol*. 2017 Nov 8;56(1):e01419-17. doi:10.1128/JCM.01419-17
9. McNeil MM, Brown JM. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 1994 Jul;7(3):357–417. PubMed PMID: 7923055; PubMed Central PMCID: PMC358331.
10. Salinas-Carmona MC, Torres-Lopez E, Ramos AI, Licon-Trillo A, Gonzalez-Spencer D. Immune Response to *Nocardia brasiliensis* Antigens in an

- Experimental Model of Actinomycetoma in BALB/c Mice. *Infect Immun.* 1999 May;67(5):2428–32. PubMed PMID: 10225905; PubMed Central PMCID: PMC115988.
11. Salinas-Carmona MC. *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. *Microbes Infect.* 2000 Sep;2(11):1373–81. doi:10.1016/s1286-4579(00)01291-0 PubMed PMID: 11018454.
 12. Solis-Soto JM, Quintanilla-Rodriguez LE, Meester I, Segoviano-Ramirez JC, Vazquez-Juarez JL, Salinas Carmona MC. In situ detection and distribution of inflammatory cytokines during the course of infection with *Nocardia brasiliensis*. *Histol Histopathol.* 2008;23(5):573–81. doi:10.14670/HH-23.573 PubMed PMID: 18283642.
 13. Gonzalez-Suarez ML, Salinas-Carmona MC, PÃ©rez-Rivera I. IgM but not IgG monoclonal anti- *Nocardia brasiliensis* antibodies confer protection against experimental actinomycetoma in BALB/c mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009 Oct;57(1):17–24. doi:10.1111/j.1574-695X.2009.00575.x
 14. Deem RL, Beaman BL, Gershwin ME. Adoptive transfer of immunity to *Nocardia asteroides* in nude mice. *Infect Immun.* 1982 Dec;38(3):914–20. PubMed PMID: 6759412; PubMed Central PMCID: PMC347836.
 15. Vera-Cabrera L, Rodríguez-Quintanilla MA, Boiron P, Salinas-Carmona MC, Welsh O. Experimental Mycetoma by *Nocardia brasiliensis* in rats. *J Mycol.* 1998;8:183–7.
 16. Kaufmann SHE. Immunity to Intracellular Bacteria. *Annu Rev Immunol.* 1993 Apr;11(1):129–63. doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.001021
 17. Dawi AFA, Mustafa MI, Fahal AH, Hassan AME, Bakhiet SM, Magoub ES, et al. The association of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles and the occurrence of eumycetoma in Sudanese patients. 7.

18. Rosas-Taraco AG, Perez-Liñan AR, Bocanegra-Ibarias P, Perez-Rivera LI, Salinas-Carmona MC. *Nocardia brasiliensis* Induces an Immunosuppressive Microenvironment That Favors Chronic Infection in BALB/c Mice. Flynn JL, editor. *Infect Immun*. 2012 Jul;80(7):2493–9. doi:10.1128/IAI.06307-11
19. Venkatswami S, Sankarasubramanian A, Subramanyam S. The Madura Foot: Looking Deep. *Int J Low Extrem Wounds*. 2012 Mar;11(1):31–42. doi:10.1177/1534734612438549
20. Arenas R, Martinez RFF, Torres-Guerrero E, Garcia C. Actinomycetoma: An Update on Diagnosis and Treatment. 5.
21. Fahal AH. Mycetoma: A global medical and socio-economic dilemma. Hotez PJ, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Apr 20;11(4):e0005509. doi:10.1371/journal.pntd.0005509
22. Vera-Cabrera L, Gómez-Flores A, Escalante-Fuentes WG, Welsh O. In Vitro Activity of PNU-100766 (Linezolid), a New Oxazolidinone Antimicrobial, against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Dec;45(12):3629–30. doi:10.1128/AAC.45.12.3629-3630.2001
23. Gomez-Flores A, Welsh O, Said-Fernández S, Lozano-Garza G, Tavaréz-Alejandro RE, Vera-Cabrera L. In Vitro and In Vivo Activities of Antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Mar;48(3):832–7. doi:10.1128/AAC.48.3.832-837.2004
24. Palomba E, Liparoti A, Tonizzo A, Castelli V, Alagna L, Bozzi G, et al. *Nocardia* Infections in the Immunocompromised Host: A Case Series and Literature Review. *Microorganisms*. 2022 May 29;10(6):1120. doi:10.3390/microorganisms10061120
25. Di Somma A, Moretta A, Canè C, Cirillo A, Duilio A. Antimicrobial and Antibiofilm Peptides. *Biomolecules*. 2020 Apr 23;10(4):652. doi:10.3390/biom10040652

26. Lazzaro BP, Zasloff M, Rolff J. Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. *Science*. 2020 May 1;368(6490):eaau5480.
doi:10.1126/science.aau5480
27. Hancock REW, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Vol. 8*. 2000;8(9):9.
28. Hancock REW, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*. 2006 Dec;24(12):1551–7.
doi:10.1038/nbt1267
29. Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Antimicrob Pept*. 13.
30. Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatisky M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today*. 2010 Jan;15(1–2):40–56.
doi:10.1016/j.drudis.2009.10.009
31. Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016 Dec 27;6. doi:10.3389/fcimb.2016.00194
32. van de Sande WWJ. Global Burden of Human Mycetoma: A Systematic Review and Meta-analysis. Vinetz JM, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Nov 7;7(11):e2550. doi:10.1371/journal.pntd.0002550
33. Easton DM, Nijnik A, Mayer ML, Hancock REW. Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives. *Trends Biotechnol*. 2009 Oct;27(10):582–90. doi:10.1016/j.tibtech.2009.07.004
34. Hancock REW, Haney EF, Gill EE. The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nat Rev Immunol*. 2016 May;16(5):321–34.
doi:10.1038/nri.2016.29

35. van der Does AM, Hiemstra PS, Mookherjee N. Antimicrobial Host Defence Peptides: Immunomodulatory Functions and Translational Prospects. In: Matsuzaki K, editor. Antimicrobial Peptides [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2019 [cited 2023 Feb 19]. p. 149–71. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-981-13-3588-4_10 doi:10.1007/978-981-13-3588-4_10
36. Scott MG, Dullaghan E, Mookherjee N, Glavas N, Waldbrook M, Thompson A, et al. An anti-infective peptide that selectively modulates the innate immune response. *Nat Biotechnol.* 2007 Apr;25(4):465–72. doi:10.1038/nbt1288
37. Choi KY (Grace), Mookherjee N. Multiple Immune-Modulatory Functions Of Cathelicidin Host Defense Peptides. *Front Immunol.* 2012;3. doi:10.3389/fimmu.2012.00149
38. Cole AM, Ganz T, Liese AM, Burdick MD, Liu L, Strieter RM. Cutting Edge: IFN-Inducible ELR⁺ CXC Chemokines Display Defensin-Like Antimicrobial Activity. *J Immunol.* 2001 Jul 15;167(2):623–7. doi:10.4049/jimmunol.167.2.623
39. Soehnlein O, Kai-Larsen Y, Frithiof R, Sorensen OE, Kenne E, Scharffetter-Kochanek K, et al. Neutrophil primary granule proteins HBP and HNP1–3 boost bacterial phagocytosis by human and murine macrophages. *J Clin Invest.* 2008 Oct 1;118(10):3491–502. doi:10.1172/JCI35740
40. Zheng Y, Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Ikeda S, Okumura K, et al. Cathelicidin LL-37 induces the generation of reactive oxygen species and release of human α -defensins from neutrophils. *Br J Dermatol.* 2007 Dec;157(6):1124–31. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.08196.x
41. Nagaoka I, Tamura H, Hirata M. An Antimicrobial Cathelicidin Peptide, Human CAP18/LL-37, Suppresses Neutrophil Apoptosis via the Activation of Formyl-Peptide Receptor-Like 1 and P2X7. *J Immunol.* 2006 Mar 1;176(5):3044–52. doi:10.4049/jimmunol.176.5.3044

42. Xie F, Zan Y, Zhang X, Zhang H, Jin M, Zhang W, et al. Differential Abilities of Mammalian Cathelicidins to Inhibit Bacterial Biofilm Formation and Promote Multifaceted Immune Functions of Neutrophils. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 9;21(5):1871. doi:10.3390/ijms21051871
43. Suarez-Carmona M, Hubert P, Delvenne P, Herfs M. Defensins: “Simple” antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015 Jun;26(3):361–70. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.12.005
44. Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2000 Jul 1;68(1):9–14. doi:10.1189/jlb.68.1.9
45. Lai Y, Gallo RL. Toll-like receptors in skin infectious and inflammatory diseases. 2009.
46. Davidson DJ, Currie AJ, Reid GSD, Bowdish DME, MacDonald KL, Ma RC, et al. The Cationic Antimicrobial Peptide LL-37 Modulates Dendritic Cell Differentiation and Dendritic Cell-Induced T Cell Polarization. *J Immunol.* 2004 Jan 15;172(2):1146–56. doi:10.4049/jimmunol.172.2.1146
47. Ferris LK, Mburu YK, Mathers AR, Fluharty ER, Larregina AT, Ferris RL, et al. Human Beta-Defensin 3 Induces Maturation of Human Langerhans Cell–Like Dendritic Cells: An Antimicrobial Peptide that Functions as an Endogenous Adjuvant. *J Invest Dermatol.* 2013 Feb;133(2):460–8. doi:10.1038/jid.2012.319
48. Mookherjee N, Hamill P, Gardy J, Blimkie D, Falsafi R, Chikatamarla A, et al. Systems biology evaluation of immune responses induced by human host defence peptide LL-37 in mononuclear cells. *Mol Biosyst.* 2009;5(5):483. doi:10.1039/b813787k
49. Lau YE, Bowdish DME, Cosseau C, Hancock REW, Davidson DJ. Apoptosis of Airway Epithelial Cells: Human Serum Sensitive Induction by the Cathelicidin

- LL-37. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006 Apr;34(4):399–409.
doi:10.1165/rcmb.2005-0170OC
50. Cardon S, Sachon E, Carlier L, Drujon T, Walrant A, Alemán-Navarro E, et al. Peptidoglycan potentiates the membrane disrupting effect of the carboxyamidated form of DMS-DA6, a Gram-positive selective antimicrobial peptide isolated from *Pachymedusa dactylos* skin. Mukherjee A, editor. *PLOS ONE*. 2018 Oct 16;13(10):e0205727. doi:10.1371/journal.pone.0205727
51. Lacombe C, Aleman-Navarro E, Drujon T, Martinez-Osorio V, Sachon E, Melchy-Pérez E, et al. Characterization of a New Immunosuppressive and Antimicrobial Peptide, DRS-DA2, Isolated from the Mexican Frog, *Pachymedusa dactylos*. Day A, editor. *Int J Inflamm*. 2024 Jan 13;2024:1–18. doi:10.1155/2024/2205864
52. Auvynet C, Joanne P, Bourdais J, Nicolas P, Lacombe C, Rosenstein Y. Dermaseptin DA4, although closely related to dermaseptin B2, presents chemotactic and Gram-negative selective bactericidal activities. *FEBS J*. 2009 Nov;276(22):6773–86. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07392.x
53. Karas Michael, Hillenkamp Franz. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*. 1988 Oct 15;60(20):2299–301. doi:10.1021/ac00171a028
54. Matsunaga N, Hayakawa K. Estimating the impact of antimicrobial resistance. *Lancet Glob Health*. 2018 Sep;6(9):e934–5. doi:10.1016/S2214-109X(18)30325-5
55. Auvynet C, Rosenstein Y. Multifunctional host defense peptides: Antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity: AMPs, the small yet big players of immunity. *FEBS J*. 2009 Nov;276(22):6497–508. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07360.x

56. García JRC, Krause A, Schulz S, Rodríguez-Jiménez FJ, Klüver E, Adermann K, et al. Human β -defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J*. 2001 Aug;15(10):1819–21. doi:10.1096/fj.00-0865fje
57. Muefong CN, Sutherland JS. Neutrophils in Tuberculosis-Associated Inflammation and Lung Pathology. *Front Immunol*. 2020 May 27;11:962. doi:10.3389/fimmu.2020.00962
58. Spinner JL, Winfree S, Starr T, Shannon JG, Nair V, Steele-Mortimer O, et al. *Yersinia pestis* survival and replication within human neutrophil phagosomes and uptake of infected neutrophils by macrophages. *J Leukoc Biol*. 2013 Nov 13;95(3):389–98. doi:10.1189/jlb.1112551
59. Rupp J, Pfeleiderer L, Jugert C, Moeller S, Klinger M, Dalhoff K, et al. Chlamydia pneumoniae Hides inside Apoptotic Neutrophils to Silently Infect and Propagate in Macrophages. Ojcius DM, editor. *PLoS ONE*. 2009 Jun 23;4(6):e6020. doi:10.1371/journal.pone.0006020
60. Parker HA, Forrester L, Kaldor CD, Dickerhof N, Hampton MB. Antimicrobial Activity of Neutrophils Against Mycobacteria. *Front Immunol*. 2021 Dec 23;12:782495. doi:10.3389/fimmu.2021.782495
61. Gaffney E, Murphy D, Walsh A, Connolly S, Basdeo SA, Keane J, et al. Defining the role of neutrophils in the lung during infection: Implications for tuberculosis disease. *Front Immunol*. 2022 Sep 20;13:984293. doi:10.3389/fimmu.2022.984293
62. Guilleams M, Svedberg FR. Does tissue imprinting restrict macrophage plasticity? *Nat Immunol*. 2021 Feb;22(2):118–27. doi:10.1038/s41590-020-00849-2
63. Mould KJ, Barthel L, Mohning MP, Thomas SM, McCubbrey AL, Danhorn T, et al. Cell Origin Dictates Programming of Resident versus Recruited

- Macrophages during Acute Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017 Sep;57(3):294–306. doi:10.1165/rcmb.2017-0061OC
64. Sun J, Siroy A, Lokareddy RK, Speer A, Doornbos KS, Cingolani G, et al. The tuberculosis necrotizing toxin kills macrophages by hydrolyzing NAD. *Nat Struct Mol Biol*. 2015 Sep;22(9):672–8. doi:10.1038/nsmb.3064
 65. Ahmad F, Rani A, Alam A, Zarin S, Pandey S, Singh H, et al. Macrophage: A Cell With Many Faces and Functions in Tuberculosis. *Front Immunol*. 2022 May 6;13:747799. doi:10.3389/fimmu.2022.747799
 66. Bucks CM, Norton JA, Boesteanu AC, Mueller YM, Katsikis PD. Chronic Antigen Stimulation Alone Is Sufficient to Drive CD8⁺ T Cell Exhaustion. *J Immunol*. 2009 Jun 1;182(11):6697–708. doi:10.4049/jimmunol.0800997
 67. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment. *J Virol*. 2003 Apr 15;77(8):4911–27. doi:10.1128/JVI.77.8.4911-4927.2003
 68. Zhang S, Wan D, Zhu M, Wang G, Zhang X, Huang N, et al. CD11b⁺CD43^{hi}Ly6C^{lo} splenocyte-derived macrophages exacerbate liver fibrosis via spleen–liver axis. *Hepatology*. 2023 May;77(5):1612–29. doi:10.1002/hep.32782
 69. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, et al. Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science*. 2009 Jul 31;325(5940):612–6. doi:10.1126/science.1175202
 70. Li Y, Liu H, Zhao D, Zhang D. Spleen contributes to chronic restraint stress-induced lung injury through splenic CD11b⁺ cells. *Int Immunopharmacol*. 2024 Jan;126:111258. doi:10.1016/j.intimp.2023.111258

71. Almaguer-Chávez JA, Welsh O, Lozano-Garza HG, Said-Fernández S, Romero-Díaz VJ, Ocampo-Candiani J, et al. Decrease of virulence for BALB/c mice produced by continuous subculturing of *Nocardia brasiliensis*. BMC Infect Dis. 2011 Dec;11(1):290. doi:10.1186/1471-2334-11-290
72. Salinas-Carmona MC, Zúñiga JM, Pérez-Rivera LI, Segoviano-Ramírez JC, Vázquez-Marmolejo AV. *Nocardia brasiliensis* Modulates IFN- γ , IL-10, and IL-12 Cytokine Production by Macrophages from BALB/c Mice. J Interferon Cytokine Res. 2009 May;29(5):263–72. doi:10.1089/jir.2008.0059
73. Meester I, Rosas-Taraco AG, Salinas-Carmona MC. Retnla down-regulation and IL-13-rich environment correlate with inflammation severity in experimental actinomycetoma by *Nocardia brasiliensis*. Pathog Dis. 2013 Apr;67(3):214–20. doi:10.1111/2049-632X.12036
74. Machelart A, Khadrawi A, Demars A, Willemart K, De Trez C, Letesson JJ, et al. Chronic Brucella Infection Induces Selective and Persistent Interferon Gamma-Dependent Alterations of Marginal Zone Macrophages in the Spleen. Roy CR, editor. Infect Immun. 2017 Nov;85(11):e00115-17. doi:10.1128/IAI.00115-17
75. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. Annu Rev Immunol. 2008 Apr 1;26(1):421–52. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326
76. Wang L, He Y, Wang P, Lou H, Liu H, Sha W. Single-cell transcriptome sequencing reveals altered peripheral blood immune cells in patients with severe tuberculosis. Eur J Med Res. 2024 Aug 29;29(1):434. doi:10.1186/s40001-024-01991-5
77. Amiano NO, Pellegrini JM, Morelli MP, Martinena C, Rolandelli A, Castello FA, et al. Circulating Monocyte-Like Myeloid Derived Suppressor Cells and CD16 Positive Monocytes Correlate With Immunological Responsiveness of

- Tuberculosis Patients. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Mar 14;12:841741. doi:10.3389/fcimb.2022.841741
78. Morais-Papini TF, Coelho-dos-Reis JGA, Wendling APB, Do Vale Antonelli LR, Wowk PF, Bonato VLD, et al. Systemic Immunological changes in patients with distinct clinical outcomes during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunobiology*. 2017 Nov;222(11):1014–24. doi:10.1016/j.imbio.2017.05.016
79. Zheng L. Generation of Myeloid Cells in Cancer: The Spleen Matters. *Front Immunol*. 2020;11.
80. Gualdrón-López M, Díaz-Varela M, Toda H, Aparici-Herraiz I, Pedró-Cos L, Lauzurica R, et al. Multiparameter Flow Cytometry Analysis of the Human Spleen Applied to Studies of Plasma-Derived EVs From *Plasmodium vivax* Patients. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Mar 1;11:596104. doi:10.3389/fcimb.2021.596104
81. Jones TPW, Dabbaj S, Mandal I, Cleverley J, Cash C, Lipman MCI, et al. The Blood Neutrophil Count After 1 Month of Treatment Predicts the Radiologic Severity of Lung Disease at Treatment End. *Chest*. 2021 Dec;160(6):2030–41. doi:10.1016/j.chest.2021.07.041
82. Cortez-Retamozo V, Etzrodt M, Newton A, Rauch PJ, Chudnovskiy A, Berger C, et al. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci*. 2012 Feb 14;109(7):2491–6. doi:10.1073/pnas.1113744109
83. Jhunjunwala S, Alvarez D, Aresta-DaSilva S, Tang K, Tang BC, Greiner DL, et al. Splenic progenitors aid in maintaining high neutrophil numbers at sites of sterile chronic inflammation. *J Leukoc Biol*. 2016 Aug 1;100(2):253–60. doi:10.1189/jlb.1HI0615-248RR
84. Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol*. 2019 Mar 22;4(33):eaau6085. doi:10.1126/sciimmunol.aau6085

85. Khanna KM, McNamara JT, Lefrançois L. In Situ Imaging of the Endogenous CD8 T Cell Response to Infection. *Science*. 2007 Oct 5;318(5847):116–20. doi:10.1126/science.1146291
86. Wu Y, Zhang S, Peng W, Li K, Li K, Jiang J, et al. Changes in Lymphocyte Subsets in the Peripheral Blood of Patients with Active Pulmonary Tuberculosis. *J Int Med Res*. 2009 Dec;37(6):1742–9. doi:10.1177/147323000903700610
87. Deveci F, Akbulut HH, Celik I, Muz MH, İlhan F. Lymphocyte Subpopulations in Pulmonary Tuberculosis Patients. *Mediators Inflamm*. 2006 Jan;2006(1):089070. doi:10.1155/MI/2006/89070
88. Domingo-Gonzalez R, Prince O, Cooper A, Khader SA. Cytokines and Chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. Jacobs Jr. WR, McShane H, Mizrahi V, Orme IM, editors. *Microbiol Spectr*. 2016 Oct 14;4(5):4.5.23. doi:10.1128/microbiolspec.TB2-0018-2016
89. Krueger JG, Eyerich K, Kuchroo VK, Ritchlin CT, Abreu MT, Elloso MM, et al. IL-23 past, present, and future: a roadmap to advancing IL-23 science and therapy. *Front Immunol*. 2024 Apr 15;15:1331217. doi:10.3389/fimmu.2024.1331217
90. Yang Y, Wu J, Li Q, Wang J, Mu L, Hui L, et al. A non-bactericidal cathelicidin provides prophylactic efficacy against bacterial infection by driving phagocyte influx. *eLife*. 2022 Feb 23;11:e72849. doi:10.7554/eLife.72849
91. Niyonsaba F, Madera L, Afacan N, Okumura K, Ogawa H, Hancock REW. The innate defense regulator peptides IDR-HH2, IDR-1002, and IDR-1018 modulate human neutrophil functions. *J Leukoc Biol*. 2013 Jul;94(1):159–70. doi:10.1189/jlb.1012497
92. Gonçalves RM, Monges BED, Oshiro KGN, Cândido EDS, Pimentel JPF, Franco OL, et al. Advantages and Challenges of Using Antimicrobial Peptides

- in Synergism with Antibiotics for Treating Multidrug-Resistant Bacteria. *ACS Infect Dis.* 2025 Feb 14;11(2):323–34. doi:10.1021/acsinfecdis.4c00702
93. Pantic JM, Radosavljevic GD, Jovanovic IP, Arsenijevic NN, Conlon JM, Lukic ML. In vivo administration of the frog skin peptide frenatin 2.1S induces immunostimulatory phenotypes of mouse mononuclear cells. *Peptides.* 2015 Sep;71:269–75. doi:10.1016/j.peptides.2015.03.028
94. He Y, Ruan S, Liang G, Hao J, Zhou X, Li Z, et al. A Nonbactericidal Anionic Antimicrobial Peptide Provides Prophylactic and Therapeutic Efficacies against Bacterial Infections in Mice by Immunomodulatory–Antithrombotic Duality. *J Med Chem.* 2024 May 9;67(9):7487–503. doi:10.1021/acs.jmedchem.4c00342
95. He Y, Shen Y, Feng X, Ruan S, Zhao Y, Mu L, et al. Tree Frog-Derived Cathelicidin Protects Mice against Bacterial Infection through Its Antimicrobial and Anti-Inflammatory Activities and Regulatory Effect on Phagocytes. *ACS Infect Dis.* 2023 Nov 10;9(11):2252–68. doi:10.1021/acsinfecdis.3c00316
96. Auvynet C, El Amri C, Lacombe C, Bruston F, Bourdais J, Nicolas P, et al. Structural requirements for antimicrobial versus chemoattractant activities for dermaseptin S9: Antimicrobial and chemotactic dermaseptin S9. *FEBS J.* 2008 Aug;275(16):4134–51. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06554.x
97. Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DME, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, et al. Modulation of the TLR-Mediated Inflammatory Response by the Endogenous Human Host Defense Peptide LL-37. *J Immunol.* 2006 Feb 15;176(4):2455–64. doi:10.4049/jimmunol.176.4.2455
98. Liu J, Chen F, Wang X, Peng H, Zhang H, Wang KJ. The Synergistic Effect of Mud Crab Antimicrobial Peptides Sphistin and Sph12–38 With Antibiotics Azithromycin and Rifampicin Enhances Bactericidal Activity Against *Pseudomonas Aeruginosa*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Oct 23;10:572849. doi:10.3389/fcimb.2020.572849

99. Winchell CG, Nyquist SK, Chao MC, Maiello P, Myers AJ, Hopkins F, et al. CD8+ lymphocytes are critical for early control of tuberculosis in macaques. *J Exp Med*. 2023 Dec 4;220(12):e20230707. doi:10.1084/jem.20230707
100. Wuerth KC, Falsafi R, Hancock REW. Synthetic host defense peptide IDR-1002 reduces inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. Jeyaseelan S, editor. *PLOS ONE*. 2017 Nov 6;12(11):e0187565. doi:10.1371/journal.pone.0187565