



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto del péptido antimicrobiano C554 y una quimiocina en la sepsis inducida con *Salmonella Typhimurium* en ratones

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
ASTRID TUXPAN PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Gerardo A. Corzo Burguete  
Dpto. Medicina Molecular y Bioprocesos  
IBT-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán  
IBT-UNAM

Dr. Roberto Carlos Muñoz Garay  
ICF-UNAM

Cuernavaca, Morelos, México. septiembre, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

“Human subtlety will never devise an invention more beautiful, more simple, or more direct than does Nature—because in her inventions, nothing is lacking—and nothing is superfluous...”

Leonardo da Vinci

## **Agradecimientos**

A mi mamá y papá, porque me han apoyado esta y todas las veces.

Al Dr. Gerardo Corzo, por permitirme formar parte de uno de sus proyectos y darme la libertad de tomar decisiones. Así como mi comité tutorial, el Dr. Víctor Bustamante y el Dr. Carlos Muñoz Garay, por ser parte del desarrollo de este trabajo y el ánimo brindado.

A los miembros del jurado, los Dres. Gustavo Pedraza, Silvia Andrea Moreno, Humberto Lanz, Edmundo Calva, por todos sus comentarios y observaciones, que me ayudaron mucho para la realización de esta tesis.

Especialmente a la Dra. Isabel Gómez Gómez, porque además de ser parte del jurado y brindarme su opinión, también me ayudó a creer y confiar en mí otra vez.

A todos los colaboradores de la Unidad de Bioterio, por todo su apoyo para la realización de este trabajo. Así como las unidades de cómputo, docencia del IBT, y a Carmen Segura por el apoyo administrativo.

A todos los miembros del grupo de los Corzos, por enseñarme y permitirme convivir con ustedes. Pero sobre todo a Diana, Mike y Andreí por ser grandes amigos fuera y dentro del laboratorio. Así como a todos los miembros del laboratorio, por compartir el espacio.

A mis amigos de maestría, porque hicieron más ligero este camino con todas las convivencias y pláticas dentro y fuera del IBT. En especial a Tom y Chava, que sin ustedes no podría ser quien soy.

A Marco IV, porque además de ser uno de mis mejores amigos has sido mi tutor durante todo este tiempo. Creo que sin ti hubiera sido un caos (más). Sé que serás un gran investigador.

A mis roomies, Mike y Andrea, por tenerme paciencia y aceptarme en todas mis modalidades; pero sobre todo por ser la pequeña familia perfecta.

Infinitas gracias a ti, que, aunque ya no estás me diste todo el amor, fuerza y ganas para continuar.

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Gerardo A. Corzo Burguete, que es miembro del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt-UNAM). Esta investigación fue realizada gracias al financiamiento de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), número IT200321, y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) al proyecto de investigación denominado "Venenos y antivenenos", número 303045, y a la beca de maestría No. 1002874.

## Contenido

1. Introducción .....	2
2. Antecedentes .....	3
2.1. Sepsis .....	3
2.2. Péptidos antimicrobianos y sepsis .....	5
2.3. <i>Salmonella</i> Typhimurium .....	8
2.4. El péptido Css54 .....	9
2.5. Quimiocinas y actividad antimicrobiana .....	9
2.6. MCP-1 .....	10
3. Justificación .....	11
4. Hipótesis .....	12
5. Objetivos .....	12
Objetivo general .....	12
Objetivos específicos .....	12
6. Materiales y métodos .....	12
6.1. Microorganismos .....	12
6.2. Línea celular .....	12
6.3. Péptido .....	13
6.4. Plásmido .....	13
6.5. Medios de cultivo .....	13
6.6. Transformación bacteriana .....	14
6.7. Expresión heteróloga de MCP-1 .....	14
6.8. Purificación del péptido MCP-1 y Css54 por HPLC .....	15
6.9. Concentración de proteína .....	15
6.10. Determinación de concentración mínima inhibitoria para <i>S. Typhimurium</i> (MIC) .....	16

6.11. Concentración bactericida mínima (MBC).....	16
6.12. Citotoxicidad .....	16
6.13. Estimulación de fagocitosis .....	17
6.14. Neutralización de LPS de <i>S. Typhimurium</i> .....	17
6.15. Inducción de sepsis en ratones.....	18
6.16. Recuento de carga bacteriana .....	18
6.17. Análisis de citocinas por citometría de flujo .....	19
6.18 Análisis estadístico .....	19
7. Resultados .....	20
7.1. Obtención de MCP-1 .....	20
7.2. Purificación del péptido C <sub>ss</sub> 54 .....	23
7.3. Concentración mínima inhibitoria .....	24
7.4. Citotoxicidad .....	25
7.5. Fagocitosis .....	26
7.6. Neutralización de LPS .....	28
7.7. Inducción de sepsis en modelo murino.....	30
7.8. Análisis de expresión de citocinas en modelo murino de sepsis .....	34
8. Discusión.....	38
9. Conclusiones .....	41
10. Perspectivas .....	42
11. Referencias .....	43
12. Anexos.....	50
12.1. Construcción del péptido MCP-1.....	50
12.2. Características físicas de ratones infectados .....	52

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Red inflamatoria durante la sepsis .....	5
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de acción de los AMPs .....	7
<b>Figura 3.</b> Gel SDS-PAGE 15% que muestra la expresión y purificación de MCP-1 .....	20
<b>Figura 4.</b> Purificación de MCP-1 por RP-HPLC .....	21
<b>Figura 5.</b> Espectro de iones m/z de la fracción proteica de MCP-1 obtenida de la purificación por RP-HPLC .....	22
<b>Figura 6.</b> Purificación de C <sub>ss</sub> 54 .....	23
<b>Figura 7.</b> Espectro de iones m/z de la fracción proteica obtenida a los 52 min de la purificación por RP-HPLC de C <sub>ss</sub> 54.....	24
<b>Figura 8.</b> Concentración mínima inhibitoria de C <sub>ss</sub> 54 y MCP-1 .....	25
<b>Figura 9.</b> Efecto de los péptidos C <sub>ss</sub> 54 y MCP-1 sobre la viabilidad de células RAW 264.7.....	26
<b>Figura 10.</b> Efecto de C <sub>ss</sub> 54 sobre la actividad fagocítica de células RAW 264.7 .....	27
<b>Figura 11.</b> Efecto de MCP-1 sobre la actividad fagocítica de células RAW 264.7 .....	28
<b>Figura 12.</b> Neutralización de LPS de <i>S. Typhimurium</i> por el péptido C <sub>ss</sub> 54 .....	29
<b>Figura 13.</b> Neutralización de LPS de <i>S. Typhimurium</i> por el MCP-1 .....	30
<b>Figura 14.</b> Control de peso de ratones con sepsis, 2 tratamientos.....	31
<b>Figura 15.</b> Control de peso de ratones con sepsis, 1 tratamiento .....	32
<b>Figura 16.</b> Recuento bacteriano en peritoneo.....	33
<b>Figura 17.</b> Recuento bacteriano en hígado y bazo .....	33
<b>Figura 18.</b> Expresión de citocinas en ratones infectados con <i>S. Typhimurium</i> y tratados con C <sub>ss</sub> 54, MCP-1 o C <sub>ss</sub> 54+MCP-1 a las 24 h .....	35
<b>Figura 19.</b> Expresión de citocinas en ratones infectados con <i>S. Typhimurium</i> y tratados con C <sub>ss</sub> 54, MCP-1 o C <sub>ss</sub> 54+MCP-1 a las 24 y 48 h .....	37

## Abreviaturas

<b>A</b>	Absorbancia	<b>MBC</b>	Concentración Bactericida Mínima
<b>AMP</b>	Péptido antimicrobiano	<b>MH</b>	Muller-Hinton
<b>BSA</b>	Albúmina de Suero Bovino	<b>MIC</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>°C</b>	Centígrado	<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>CC</b>	Cisteína cisteína	<b>mL</b>	Mililitro
<b>CFU</b>	Unidad Formadora de Colonia	<b>NDBP</b>	Non-disulfide brigde peptide
<b>CLSI</b>	Clinical Laboratory Standars Institute	<b>nm</b>	Nanómetro
<b>Da</b>	Dalton	<b>PAMP</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>DAMP</b>	Patrones moleculares asociados a daño	<b>PM</b>	Peso Molecular
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>D.O.</b>	Densidad Óptica	<b>T</b>	Temperatura
<b>EU</b>	Unidad de Endotoxina	<b>TFA</b>	Ácido Trifluoroacético
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia	<b>TLR</b>	Receptor Tipo Toll
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido	<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>LAL</b>	Lisado de Amebocitos del Limulus	<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramo
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido	<b><math>\mu</math>M</b>	Micromolar

## Resumen

El uso desmedido de antibióticos ha contribuido al incremento de bacterias multidrogo resistentes, provocando una emergencia global; es por ello que se ha propuesto el uso de péptidos antimicrobianos (AMPs) como posible alternativa para el tratamiento de infecciones sistémicas. En el laboratorio se ha analizado el efecto antimicrobiano de venenos de distintas especies de alacrán, como es el caso del péptido Css54, derivado del alacrán *Centruroides suffusus suffusus*.

Así mismo, se ha trabajado en la obtención de proteínas recombinantes con posible efecto terapéutico, como es el caso de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), expresada heterológicamente en *E. coli*.

En el presente trabajo se exploró el efecto de Css54 y MCP-1 en una sepsis inducida con *Salmonella Typhimurium* en un modelo *in vitro* e *in vivo*. Se analizó si las dos proteínas tienen efecto antimicrobiano, así como neutralizante de LPS de la bacteria, así mismo se evaluó su efecto en la actividad fagocítica de macrófagos y posteriormente se analizó si ambos péptidos tienen efecto inmunomodulador en un modelo murino. Los resultados mostraron que Css54 presenta efecto antimicrobiano y neutralizante incluso a bajas concentraciones, mientras que MCP-1 no presenta actividad. Además, ambas moléculas mostraron ser benéficas para la actividad fagocítica en línea celular. De acuerdo a los resultados del modelo *in vivo*, ninguna de las dos moléculas logró reducir la carga bacteriana en peritoneo ni órganos; los resultados sugieren que MCP-1 regula la expresión de citocinas, mientras que Css54 podría estar presentando efecto antiinflamatorio.

## 1. Introducción

La definición más reciente de sepsis se desarrolló en 2016 y se trata de la disfunción de órganos potencialmente mortal causada por la respuesta no regulada a una infección (Singer et al., 2016). Es la causa común de muerte para infecciones severas, incluyendo infecciones bacterianas en el torrente sanguíneo, enfermedades diarreicas, infecciones del tracto respiratorio, malaria, dengue, e infecciones sistémicas fúngicas (World Health Organization (WHO), 2020). De acuerdo a la OMS, la mortalidad de la sepsis está frecuentemente relacionada a una mala calidad de cuidado, inadecuada infraestructura de salud, diagnósticos tardíos, así como administración clínica inapropiada. Por lo anterior, combatir la sepsis forma parte integral para cumplir los objetivos del desarrollo sostenible (SDGs, por sus siglas en inglés) relacionados a salud y bienestar, y su prevención está relacionada con combatir la resistencia antimicrobiana (World Health Organization (WHO), 2020).

Existen dos retos principales en el tratamiento contra la sepsis, uno es la variedad de bacterias capaces de diseminarse e inducir la reacción inflamatoria; el otro es la respuesta rápida a la infección que inicia el hospedero, en donde se da la liberación de distintas citocinas (Heinbockel et al., 2013). Es por ello que aún no existe un tratamiento específico para esta patología, además del incremento de la resistencia bacteriana, que representa uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo. Una de las alternativas para el desarrollo de nuevos tratamientos es el diseño de agentes que no sean susceptibles a dicha resistencia como lo son los péptidos antimicrobianos.

Los AMPs al ser componentes clave de la respuesta inmune innata de todos los organismos multicelulares, son muy selectivos para membranas procariotas además de que presentan distintos mecanismos de disrupción de las mismas, por lo que las bacterias podrían presentar muy poca resistencia (Harrison, Abdel-rahman, Miller, & Strong, 2014). Por otro lado, existen otras células del sistema inmune como las quimiocinas, que son un importante mediador proinflamatorio capaz de inducir la migración e infiltración de monocitos, macrófagos y otras células inmunes a tejidos dañados (Luo, Shao, Jiao, Yu, & Rong, 2018).

En esta tesis se propone el uso de un péptido antimicrobiano derivado del veneno del escorpión *Centruroides suffusus suffusus* junto con una quimiocina, MCP-1, como tratamiento contra sepsis provocada por *Salmonella Typhimurium* y se evalúa su posible efecto inmunomodulador en un modelo murino, así como su impacto en un modelo *in vitro*.

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Sepsis**

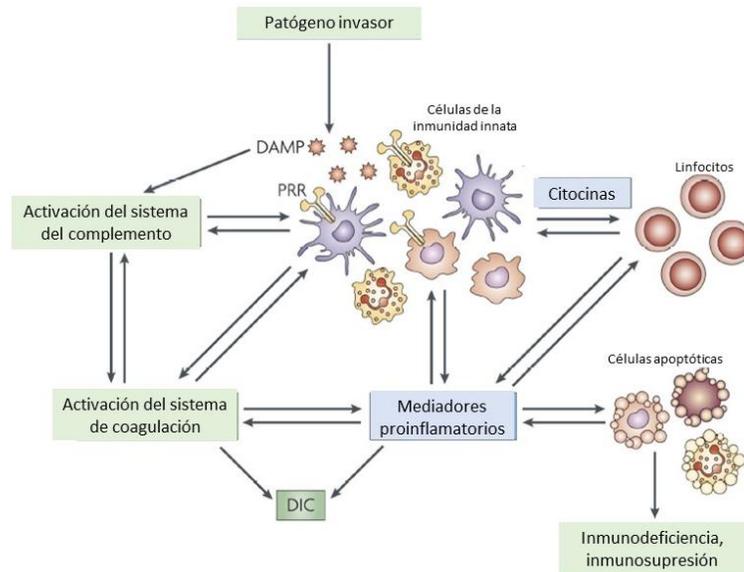
La sepsis es un síndrome clínico resultado de la respuesta inflamatoria no regulada a infecciones microbianas, que conlleva a la disfunción de órganos vitales entre los que se encuentran el corazón, pulmones y riñones. La sepsis severa y el shock séptico son las principales causas de muerte en pacientes nosocomiales (Ayalon et al., 2018). De acuerdo a la OMS, 11 millones de personas mueren por sepsis cada año, 41% de los casos ocurren en niños menores de 5 años de edad. Se estima que la mortalidad en pacientes tratados por sepsis en las unidades de cuidado intensivo es de 42%. Hasta el 2020, se estimó una incidencia de 189 casos de sepsis en adultos tratados en hospitales por cada 100,000 personas al año, con una mortalidad del 26.7%. Además, el 85% de los casos y 84.8% de las muertes relacionadas a sepsis en el mundo, ocurren en países con índice sociodemográfico bajo, medio-bajo o medio (World Health Organization (WHO), 2020). Se ha estimado que las causas más comunes de incidencia de sepsis son las enfermedades diarreicas, infecciones respiratorias, desordenes maternos y desordenes neonatales, ocurriendo la mayoría de los casos en países en vías de desarrollo. Se estima que en México hay una incidencia de sepsis de 340 a 440 de casos por cada 100,000 habitantes (Rudd et al., 2020).

La respuesta normal a una infección es un proceso complejo que incluye la activación de células fagocíticas circulantes, así como la generación de mediadores proinflamatorios y anti-inflamatorios. Esta respuesta inicia cuando células del sistema inmunitario innato, particularmente macrófagos y neutrófilos, reconocen y se unen a componentes microbianos. Esto se puede dar de diferentes maneras, la primera se basa en los receptores que se expresan en las células inmunes, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), en estos se incluyen los receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo NOD, entre otros. La segunda estrategia es la identificación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), los cuales son consecuencia de la inflamación e infección; aquí se incluyen alarminas, proteínas de choque térmico y ácido úrico. En un tercer caso ocurre la detección de moléculas que se expresan en células sanas pero no en las infectadas, por lo tanto, el reconocimiento de dichas moléculas indica salud normal inhibiendo la activación del sistema inmune innato contra un tejido sano. Un ejemplo de ello son las células natural killer que atacan preferentemente solo a las células infectadas que desregulan proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I. (Kaur & Secord, 2019). Tras la respuesta al patógeno, se da la liberación de mediadores pro-inflamatorios, que de exceder los límites del sitio

de infección, pueden conducir a una respuesta inflamatoria generalizada (Taeb, Hooper, & Marik, 2017). Es importante considerar que la función de una célula del sistema inmune en respuesta a un patógeno, depende tanto de la línea celular como de su activación específica (Rivera, Siracusa, Yap, & Gause, 2016).

La respuesta inmune innata y adaptativa observada en la sepsis se da en pasos bifásicos, una fase temprana de hiperactivación inmunológica y una fase crónica tardía llamada inmunosupresión persistente. La primera fase frecuentemente lleva a una inflamación extendida, múltiples órganos fallan y ocurre un fenómeno conocido como tormenta de citocinas, donde una gran cantidad de citocinas proinflamatorias son liberadas, principalmente: TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6. En cambio, durante la inmunosupresión persistente ocurren, infecciones secundarias y eventualmente la muerte del individuo debido a la respuesta hiper inflamatoria (Askar, Higgins, Barrow, & Foster, 2020; Darkwah et al., 2019), en donde las citocinas expresadas a mayor concentración son principalmente IL-6, IL-12p70, IL-17 e IL-8 (Andaluz-Ojeda et al., 2012; Angurana, Bansal, Muralidharan, Aggarwal, & Singhi, 2021). Se ha observado que un incremento en los niveles de apoptosis en linfocitos y células dendríticas contribuyen a la supresión de la respuesta inmune durante la sepsis (Hotchkiss & Nicholson, 2006).

Además de la producción de citocinas proinflamatorias, existen otros mediadores inflamatorios durante la patogénesis, tales como C5a, un componente del sistema del complemento que actúa como un mediador central, ya que es un potente quimioatrayente de neutrófilos y macrófagos (Kew, 2014), y además modula la cascada de coagulación, la respuesta del TLR4 y la liberación del factor inhibitorio de migración de macrófagos (MIF, por sus siglas en inglés). MIF es una citocina que conecta el sistema inmune con el sistema endocrino además de activar macrófagos y células T; se ha observado que una producción excesiva de MIF está relacionada con la fase aguda de la enfermedad debido a que sus efectos contribuyen a la disfunción de órganos y al desequilibrio del sistema de coagulación. Además, la presencia de microorganismos en la sangre causa una activación del sistema del complemento, resultando en una producción excesiva de C5a. Simultáneamente se da la activación del sistema de coagulación y la inhibición de la fibrinólisis, lo que conlleva a una coagulación intravascular diseminada (DIC) la cual es una de las mayores complicaciones de la sepsis (Figura 1) (Rittirsch, Flierl, & Ward, 2008).



**Figura 1.** Red inflamatoria durante la sepsis. La liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) de microorganismos invasores resultan en la sobre estimulación de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en las células inmunes, lo que conlleva a la liberación excesiva de mediadores proinflamatorios y sus consecuencias. Modificado de Rittirsch et al., 2008.

Uno de los principales problemas en el tratamiento contra la sepsis es que los fármacos eficientes deben ser capaces de matar a las bacterias sin liberar las toxinas que inducen la inflamación, como son el lipopolisacárido, LPS, en Gram- negativas, y otros remanentes bacterianos (Brandenburg, Heinbockel, Correa, & Lohner, 2016). El uso de péptidos antimicrobianos se ha considerado una opción viable debido a que, al ser catiónicos, establecen interacciones electrostáticas con los LPS cargados negativamente permitiendo su unión y neutralización. Además, la hidrofobicidad y carga positiva de los AMPs incrementa dicha habilidad de unión (Sun & Shang, 2015). Hasta el día de hoy, no existe ningún tratamiento contra la sepsis que conlleve el uso de AMPs.

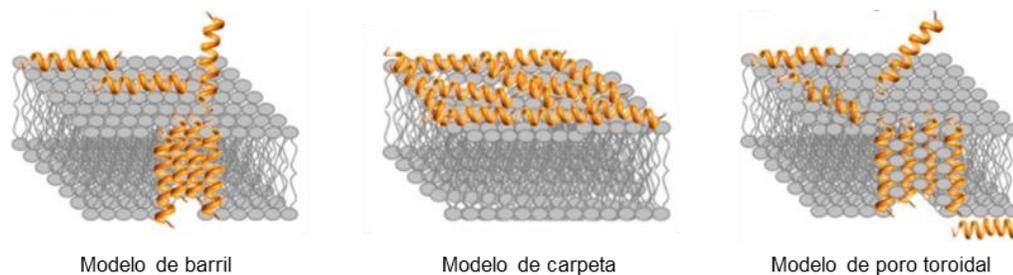
## 2.2. Péptidos antimicrobianos y sepsis

Los péptidos antimicrobianos (AMPs, por sus siglas en inglés) son péptidos cortos de 10 a 50 aminoácidos, con una carga neta positiva (generalmente de +2 a +9), y una porción (mayor o igual al 30%) de residuos hidrofóbicos (Hancock & Sahl, 2006). Forman parte del sistema inmune innato de los organismos multicelulares y tienen como blanco patógenos invasores incluyendo bacterias, virus y parásitos (Martin, van Meegern, Doemming, & Schuerholz, 2015). La

hidrofobicidad, cationicidad y estructura secundaria están implicadas en su efecto antimicrobiano (Farnaud et al., 2004).

Los AMPs previenen y controlan infecciones microbianas de dos formas en todos los organismos: por modulación de la respuesta inmune innata o matando directamente al agente microbiano (Martin et al., 2015). En ambos casos la secuencia anfipática de los AMPs les permite interactuar con la membrana celular de los microorganismos (Bhattacharjya, 2010) cargada negativamente debido a la gran cantidad de fosfolípidos en ella (Zaslhoff, 2002). Cuando actúan como reguladores de la respuesta inmune, pueden alterar la expresión de genes, actuando como quimiocinas o como inductores de la producción de las mismas, de igual forma pueden inhibir al LPS, promover la curación de heridas, y modular la respuesta de células dendríticas o células T de la respuesta inmune adaptativa (Lai & Gallo, 2009). Por otro lado, para matar directamente al agente microbiano, después de su inserción en la membrana, los AMPs actúan rompiendo la integridad física de la bicapa, con formación de poros, disrupción de la barrera, o traslocamiento a través de la membrana para actuar en blancos internos como proteínas o DNA (Hancock & Sahl, 2006).

Se han propuesto diversos modelos para explicar la permeabilización de las membranas por los AMPs: modelo de barril, carpeta y poro toroidal. En el primer caso, los péptidos con estructura de hélices forman un paquete en la membrana con un lumen central, las regiones hidrofóbicas de los péptidos se alinean con la región lipídica de la bicapa y la región hidrofílica del péptido forma un poro en el interior. En el modelo de carpeta los péptidos se acumulan en la superficie de la bicapa, estos son atraídos electrostáticamente a las regiones aniónicas de los fosfolípidos cubriendo la superficie de la membrana en una forma de carpeta, a altas concentraciones de péptido, estos alteran la membrana celular formando micelas. Finalmente, en el modelo de poro toroidal, los péptidos se insertan en la membrana e inducen a las capas lipídicas a doblarse continuamente permitiendo la entrada de agua y iones a la célula (Figura 2) (Brogden, 2005).



**Figura 2.** Mecanismos de acción de los AMPs. Modificado de Kumar et al., 2018.

De acuerdo a las características y mecanismos de acción de los AMPs se han diseñado péptidos que podrían actuar contra sepsis causada por bacterias Gram-negativas. En 2016 Kim et al. desarrollaron un péptido híbrido de 32 aminoácidos denominado Syn-GNU7, con una estrategia basada en la construcción de un péptido de fusión combinando dos componentes esenciales, un dominio de unión a LPS y un dominio de muerte bacteriana unidos con un linker flexible y corto; este péptido es altamente catiónico (+12) e hidrofóbico. Syn-GNU7 mostró actividad antimicrobiana contra Gram+ y Gram-, pero preferentemente contra éstas últimas tales como *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*, con una MIC de 0.5 y 1  $\mu\text{M}$  respectivamente. El péptido presenta también una baja toxicidad contra queratinocitos. De igual forma, la expresión de mRNA de citocinas proinflamatorias como IL-1B y IL-6 fue altamente inhibida cuando se incubaron células de macrófago con LPS y el péptido, por lo que este péptido podría inhibir los efectos en sepsis inducida con LPS ( Kim, Jang, Kim, & Cho, 2016).

Otro AMP probado contra sepsis inducida es el Pap12-6, un péptido sintético de 12 residuos derivado de la cecropina encontrada en la larva de mariposa *Papilio xuthus*. Este AMP con estructura  $\alpha$ -hélice es capaz de desestabilizar y permeabilizar la membrana bacteriana, y presenta una potente actividad antibacteriana contra Gram-negativas con una MIC de 4 y 8  $\mu\text{M}$  para *E. coli* y *S. Typhimurium*, respectivamente. Pap12-6 contiene dos residuos de triptófano, interactúa eficientemente con los LPS cargados negativamente en la membrana de *E. coli* y neutraliza los LPS en modelos de shock séptico con ratones, resultando en una alta actividad antibacteriana y antiinflamatoria. El péptido al unirse con el LPS inhibe la activación de NF- $\kappa$ B y por lo tanto la producción de citocinas por macrófagos estimulados con LPS, ya que se bloquea la activación del TLR4 a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  del péptido, por lo que se mejora la respuesta inflamatoria

excesiva durante la sepsis, previniendo la disfunción de órganos e inhibiendo el crecimiento bacteriano (Kim et al., 2019).

Hasta el momento no se han reportado más AMPs que muestren una gran actividad antiinflamatoria contra *S. Typhimurium*.

### **2.3. *Salmonella Typhimurium***

*Salmonella Typhimurium* es una bacteria Gram- negativa, en forma de bacilo, anaerobia facultativa, no forma esporas y tiene motilidad peritrica. Se transmite por vía oral, por la ingesta de alimentos o agua contaminados y posee un amplio rango de hospederos, puede generar enfermedad gastrointestinal en los humanos, infección sistémica en ratones y un cuadro crónico asintomático en aves (Barreto et al., 2016).

*S. Typhimurium* posee diferentes estrategias para su virulencia: la mayoría de los genes que codifican para los factores de virulencia se localizan en las denominadas islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs, por sus siglas en inglés), mientras que otros se encuentran en su plásmido de virulencia pSLT (Fàbrega, 2013). Los receptores tipo Toll (TLRs) que se localizan en la membrana externa de las células, son los primeros receptores que detectan la presencia de *Salmonella* y pueden ser activados por diferentes ligandos, tales como los lipopolisacáridos (TLR4), flagelina Flic (TLR5) y lipoproteínas (TLR1/2/6) y posteriormente inducir la respuesta inmune para la producción de citocinas proinflamatorias (Broz, Ohlson, Monack, & Immunity, 2012).

La infección con *S. Typhimurium* empieza con la ingesta de organismos en agua o alimentos contaminados. El primer obstáculo que tiene que sobrepasar la bacteria es el pH ácido del estómago, para ello activa la respuesta de tolerancia ácida (ATR). Posteriormente, *Salmonella* debe atravesar la capa mucosa intestinal antes de adherirse a las células epiteliales del intestino. En ratones, la bacteria se adhiere preferentemente a las células M de las placas de Peyer en el epitelio intestinal (Jones, Ghorri, & Falkow, 1994). Después de la adhesión, ocurren rearrreglos del citoesqueleto lo cual conlleva a la disrupción de la barrera epitelial e induce la formación de vacuolas contenedoras de *Salmonella* (SCVs), los únicos compartimentos intracelulares en los que la bacteria puede sobrevivir y replicarse. Simultáneamente, se inicia el reclutamiento y migración de fagocitos del espacio submucoso al lumen intestinal, este proceso se asocia con la producción de citocinas proinflamatorias como TNF e IL-8 (Fàbrega, 2013).

En una infección sistémica en ratones, la bacteria invade rápidamente el intestino, posteriormente los nodos linfoides y eventualmente diferentes órganos como el hígado y el bazo (Herrero-fresno & Olsen, 2018).

#### **2.4. El péptido C<sub>ss</sub>54**

En 2013 García *et al.* aislaron del veneno de alacrán *Centruroides suffusus suffusus* un péptido de 25 aminoácidos, de tipo que no forma puentes disulfuros (NDBP) y con una masa molecular de 2,870.4 Da al que denominaron C<sub>ss</sub>54, el sufijo 54 corresponde a la fracción proteica donde fue hallado. El péptido genera una estructura alfa-hélice en ambientes hidrofóbicos, esto debido a su gran cantidad de residuos alifáticos e hidrofílicos propensos a generar este tipo de estructura secundaria. Se determinó que C<sub>ss</sub>54 tiene efecto antimicrobiano ante bacterias Gram-positivas y Gram- negativas como *S. aureus* y *E. coli* con una concentración mínima inhibitoria de 12.5 µg/mL para ambos casos (García et al., 2013). También se le probó *in vitro* en presencia de antibióticos usados para el tratamiento de tuberculosis, tales como Etambutol, Pirazinamida, Isoniacida y Rifampicina, y se comprobó que se presenta un efecto sinérgico entre el péptido y dichos antibióticos, posiblemente a que el AMP permea las membranas lipídicas y promueve la difusión de antibióticos de bajo peso molecular (García et al., 2013).

#### **2.5. Quimiocinas y actividad antimicrobiana**

Las quimiocinas son proteínas pequeñas, normalmente de 70 a 100 residuos aminoácídicos, producidas por diferentes tipos de células, especialmente leucocitos, y que están asociadas a un efecto quimiotáctico. Su función principal es inducir la migración y activación de células específicas, especialmente células inmunes en respuesta a daños en el organismo (Crawford et al., 2019; Yao & Tsirka, 2014). También se ha observado que las quimiocinas participan en el desarrollo de órganos, angiogénesis, curación de heridas y generación y regulación de la inmunidad innata y adaptativa (Chensue, 2001; Griffith, Sokol, & Luster, 2014).

La superfamilia de las quimiocinas está clasificada con base en el número y espacio de los dos primeros residuos conservados de cisteína en el amino terminal: CXC, CC, C, CX3C (donde X es un aminoácido) (Esche, Stellato, & Beck, 2005). Estas proteínas mantienen una estructura terciaria muy conservada que consiste en un N-terminal flexible, un N-loop, tres hojas β-antiparalelas y un α-hélice en el C-terminal (Deshmane et al., 2009).

Algunas quimiocinas presentan actividad antimicrobiana debido a que poseen estructuras anfipáticas que contienen parches de aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos. La anfipaticidad es una característica particular del  $\alpha$ -hélice del C-terminal, lo que sugiere que el efecto antimicrobiano es ejercido por esta región. También se presume que las quimiocinas se localizan en la membrana bacteriana debido a interacciones electrostáticas, y posteriormente alteran las funciones de la barrera membranal resultando en la muerte celular. Por ejemplo, CXCL10 despolariza las membranas bacterianas de *B. anthracis*, mientras que CXCL6 y CCL28 causan disrupción membranal en *E. coli* y *C. albicans*, respectivamente (Crawford et al., 2019; Yung & Murphy, 2012).

Se cree que algunas quimiocinas presentan actividad antimicrobiana ya que comparten características con los péptidos antimicrobianos tales como las defensinas. Ambas proteínas presentan estructura de hojas  $\beta$  con cuatro o seis cisteínas conservadas, tienen una carga catiónica, y pI mayor a 8.0, y su efecto antimicrobiano ocurre a concentraciones micromolares. La actividad de las quimiocinas puede ser atenuada por altas concentraciones de sales (Yang et al., 2003; Yung & Murphy, 2012). Además, estas proteínas pueden ser producidas por los mismos estímulos como la IL-1, TNF y ligandos de los TLR (Esche et al., 2005).

## **2.6. MCP-1**

La proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), también conocida como CCL2, pertenece a la familia de las quimiocinas CC y tiene 76 aminoácidos, presenta gran actividad quimiotáctica hacia monocitos, células T y células dendríticas además de promover la secreción de IL-4, una citocina anti-inflamatoria, y LTB<sub>4</sub>, un atrayente de neutrófilos (Gu et al., 2000; Kundumani-Sridharan et al., 2013; Matsukawa et al., 1999). La MCP-1 es secretada en respuesta a una variedad de estímulos, incluyendo agentes infecciosos y citocinas inflamatorias (Serbina & Pamer, 2006).

Se ha observado que MCP-1 tiene un papel importante en la curación de heridas ya que se expresa en la etapa temprana de una lesión, y es esencial para la respuesta de los monocitos y macrófagos. El tratamiento con MCP-1 en heridas de ratones diabéticos aumenta la infiltración de macrófagos y con ello la mejoría en la curación de estas (Wood et al., 2014).

Existe evidencia de que MCP-1 podría ser benéfico en modelos murinos con sepsis. En 2006 Gomes et al., demostraron que ratones deficientes de *mcp-1* son más susceptibles al síndrome

de respuesta inflamatoria sistémica y a sepsis inducida por LPS de *E. coli*. Los macrófagos de estos ratones produjeron niveles elevados de citocinas proinflamatorias como MIF y TNF, así como bajos niveles de IL-10, además se observó que se aumentaba la mortalidad en un periodo de 6 días después de la infección. Esos resultados sugieren que niveles endógenos de MCP-1 tienen efectos antiinflamatorios, protegiendo de la letalidad a través de la producción de IL-10 por macrófagos (Gomes et al., 2006). Por otro lado, Matsukawa et al. (1999) probaron que la neutralización de MCP-1 incrementaba la letalidad en un modelo de sepsis peritoneal, lo cual se asociaba a la reducción del reclutamiento y activación de macrófagos y neutrófilos. Además, se observó que MCP-1 aumenta los niveles de LTB<sub>4</sub>, por lo cual MCP-1 tendría efectos benéficos durante la evolución de la sepsis a través del reclutamiento de varias subpoblaciones de leucocitos necesarias para eliminar a los microorganismos (Matsukawa et al., 1999).

Finalmente, Wang et al. (2018) determinaron en pacientes enfermos de sepsis, que los niveles de MCP-1 en el plasma sanguíneo son incrementados respecto al control en el primer día después del trauma y se reducen durante el desarrollo de la patología, por lo que esta proteína podría ser un biomarcador para la predicción de la sepsis en pacientes nosocomiales (Wang et al., 2018).

### **3. Justificación**

En la actualidad no existen tratamientos totalmente eficientes contra la sepsis debido a que en la mayoría de los casos no se conoce el patógeno causal, por lo cual se recurre al uso de antibióticos de alto espectro incrementando el riesgo de crear resistencia bacteriana, además de que se da una posible liberación de sustancias proinflamatorias por la respuesta rápida del hospedero.

El uso de AMPs y quimiocinas podría ser una gran alternativa de tratamiento debido a su capacidad de unión a los componentes bacterianos y reclutamiento de células del sistema inmune, respectivamente, que podrían actuar como moduladores de la respuesta inmune y aliviar la infección inhibiendo los remanentes bacterianos sin causar resistencia.

En nuestro laboratorio se ha determinado que el péptido C55 muestra efecto antimicrobiano contra bacterias Gram-negativas como Gram-positivas, por lo que es interesante analizar si también presenta un efecto benéfico contra sepsis bacteriana. Además, resulta

importante analizar si una quimiocina del tipo de MCP-1 tiene efecto antimicrobiano y cuál es su papel en la patología, ya que hasta ahora no existen trabajos que lo demuestren claramente.

#### **4. Hipótesis**

El péptido Css54 y la quimiocina MCP-1 favorecerán la resolución de la sepsis inducida con *Salmonella Typhimurium*.

#### **5. Objetivos**

##### ***Objetivo general***

Determinar si el péptido Css54 y MCP-1 presentan efecto inmunomodulador en un modelo murino de sepsis.

##### ***Objetivos específicos***

- Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del péptido Css54 y la quimiocina MCP-1 contra *S. Typhimurium*.
- Determinar *in vitro* la fagocitosis de *S. Typhimurium* inducida por el estímulo con Css54 y MCP-1.
- Analizar la actividad antimicrobiana y expresión de citocinas inducidas por Css54 y MCP-1 en un modelo murino de sepsis.

#### **6. Materiales y métodos**

##### ***6.1. Microorganismos***

Se utilizó la cepa de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 preservada en viales con glicerol al 30% a -70°C. Para su uso las bacterias fueron sembradas por estría en agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) o en medio LB e incubadas a 37°C por 24 h.

##### ***6.2. Línea celular***

Como modelo se utilizó la línea celular RAW 264.7 ATCC TIB-71. Las células se cultivaron en cajas de 100 mm con medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFBi),

esto es, suero incubado a 55°C por 30 min; en incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando las células alcanzaron del 70% al 80% de confluencia, se retiró el medio y se realizaron pases para mantener la viabilidad celular.

### 6.3. Péptido

Se usó el péptido sintético C<sub>ss</sub>54, realizado por la compañía GenScript (Piscataway, Nueva Jersey, Estados Unidos), cuyas características se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos y peso molecular del péptido.

<i>Péptido</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Peso molecular (Da)</i>	<i>pI</i>	<i>Carga</i>	<i>Referencia</i>
C <sub>ss</sub> 54	FFGSLLSLGSKLLPSVFKLFQRKKE	2,870.4	10.46	+5	Garcia et al., 2013

### 6.4. Plásmido

Para la expresión de la MCP-1 se utilizó el plásmido pQE30::MCP-1-3, el cual había sido diseñado y construido con anterioridad (Corrales, 2018, datos no publicados). A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína.

---

#### Secuencia de la proteína pQE30::MCP-1-3

---

MRGSHHHHHHGSENLYFQGQPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKE  
AVIFKTIVAKEICADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPKT

---

### 6.5. Medios de cultivo

Para la expresión de la MCP-1 se probaron los medios de cultivo de la tabla 2.

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo.

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Composición (g/L)</b>		<b>Comentarios</b>
	Triptona	10	Ajustar a pH 7 y esterilizar en autoclave.
LB	Extracto de levadura	5	
	NaCl	10	
2xYT	Triptona	16	

---

MmLB	Extracto de levadura	10	Ajustar a pH 7 y esterilizar
	NaCl	5	en autoclave.
	Triptona	20	Ajustar a pH 7 y esterilizar
	Extracto de levadura	30	en autoclave.
	NaCl	21	El MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.7% y la
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.5	glucosa 0.5% se agregan al
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.5	medio al momento de
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5	inducir el cultivo.
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.7%	
Glucosa	0.5%		

### 6.6. Transformación bacteriana

Para la transformación del plásmido que expresa a la MCP-1, 100 µL de células quimiocompetentes *E. coli* Origami y 2 µL de plásmido se incubaron por 30 min en hielo, posteriormente se realizó un choque térmico por 30 s a 42°C y después se incubó la reacción 5 min en hielo. Se agregaron 250 µL de medio SOC y se incubó a 37°C por 1 h. Finalmente, se plaquearon 20 µL de la reacción en caja Petri con agar LB y ampicilina, y se incubó a 37°C por 12 h. Las colonias observables fueron aquellas que incorporaron el vector pQE30::MCP-1-3 ya que son capaces de crecer en el medio con antibiótico.

### 6.7. Expresión heteróloga de MCP-1

A partir de las células recién transformadas, se tomó una colonia y se inoculó en medio LB + ampicilina (100 µg/mL). El cultivo se incubó a 37°C por 16 h en agitación. Se tomaron 10 mL del cultivo anterior y se adicionaron a 1 L de medio LB, 2xYT o MmLB + ampicilina (100 µg/mL) y se incubó a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8 a 0.9 medida a 600 nm. Se adicionó el inductor IPTG a una concentración de 0.5 mM y posteriormente se incubó el cultivo a 16°C, 18 h, 200 rpm.

Finalizada la inducción las células se cosecharon mediante centrifugación a 7,000 rpm por 15 min a 4°C en una centrífuga Beckman Coulter Avanti J-30I. El pellet resultante se resuspendió en buffer Tris-HCl 0.05 M pH 8.0 y posteriormente las células se rompieron en la prensa francesa One Shot *cell disruptor* (Constant Systems®) a una presión de 30 kpsi. Finalmente, el lisado celular se

sometió a centrifugación 10,000 rpm, 15 min (Beckman Coulter Avanti J-30I®, rotor JA-14) para obtener la fracción soluble (sobrenadante) e insoluble (pellet), se tomó una muestra de las fracciones para ser analizadas en un gel SDS-PAGE.

La proteína recuperada en la fracción soluble se purificó mediante cromatografía de afinidad usando una columna que contiene la resina Ni-NTA (QiaGen®). La proteína unida a la fase sólida se eluyó con buffer de elución (Tris-HCl 50 mM + 400 mM imidazol, pH 8.0), se colectaron fracciones de 1 mL para analizarlas en un gel de SDS-PAGE al 15% para verificar la purificación.

### ***6.8. Purificación del péptido MCP-1 y C<sub>ss</sub>54 por HPLC***

Para el proceso de purificación de MCP-1 por HPLC en fase reversa, se utilizó una columna C4 analítica (Vydac 214TP 4.6 x 250 mm) usando el solvente A (agua + TFA 0.01%) y el solvente B (acetonitrilo + TFA 0.1%); con un gradiente de 0 a 60% de solvente B desde el minuto 5 hasta el minuto 65, y con un flujo de 1 mL/min.

En el caso del péptido C<sub>ss</sub>54, se utilizó una columna analítica C18 (Vydac 218TP 4.6 x 250 mm) usando el solvente A (agua + TFA 0.01%) y el solvente B (acetonitrilo + TFA 0.1%); con un gradiente de 0 a 60% de solvente B desde el minuto 5 hasta el minuto 65, y con un flujo de 1 mL/min.

### ***6.9. Concentración de proteína***

El rendimiento de la purificación de la proteína MCP-1 se obtuvo midiendo la absorbancia a 280 nm, y con ayuda del coeficiente de extinción molar, siguiendo la ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon d c$$

Dónde:

A: la absorbancia de cada péptido a 280 nm

$\epsilon$ : coeficiente de extinción molar de la proteína ( $0.935 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

d: distancia que atraviesa el haz de luz (1.0 cm)

c: concentración de la sustancia absorbente en el medio (M o mol/L).

En el caso del péptido C<sub>ss</sub>54, el rendimiento se obtuvo por el método de Bradford. Para ello, en una placa de 96 pozos se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de muestra a cuantificar y se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de

Protein Assay (Bio-Rad) (diluida 1:5 en agua). Se incubó 5 min a T ambiente y se leyó la absorbancia a 595 nm. Se preparó una curva estándar con BSA en solución salina (NaCl 150 mM) y a partir de ésta se determinó la concentración de proteína. Se utilizaron 10 µL de solución salina como blanco.

#### **6.10. Determinación de concentración mínima inhibitoria para *S. Typhimurium* (MIC)**

La actividad antimicrobiana del péptido y MCP-1 se determinó por el ensayo de microdilución seriada (Arenas et al., 2016). Para ello se realizaron diluciones de C54 y MCP-1 de acuerdo con el estándar de la CLSI. Los péptidos diluidos en caldo Mueller-Hinton (50 µL) se incubaron en una placa de 96 pozos con 50 µL de la suspensión celular ( $\approx 1 \times 10^8$  bacterias/mL). La mezcla se incubó a 37°C por 18 h y posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm. La concentración más baja a la que el péptido o la quimiocina inhiben el crecimiento es la MIC. Se utilizó ceftriaxona 100 µg/mL como control positivo y cultivo bacteriano como control negativo, también se incubaron caldo MH y la última dilución del péptido para comprobar su esterilidad.

#### **6.11. Concentración bactericida mínima (MBC)**

Para determinar si el péptido es bactericida o bacteriostático se realizó el ensayo de concentración bactericida mínima, además de que proporciona la concentración a la cual se logra inhibir el 99.9% de las bacterias en el medio. Este ensayo se realiza a partir del resultado de la MIC, para ello se tomaron 10 µL de los pozos donde se inhibió el crecimiento y se sembraron en agar MH. La placa se incubó a 37°C por 24 h. La concentración mínima que inhibió el crecimiento bacteriano se determinó como la MBC, si ésta es menor a cuatro veces el valor de la MIC se considera que el péptido es bactericida (French, 2006).

#### **6.12. Citotoxicidad**

Mediante ensayo colorimétrico CellTiter 96® AQueous One Solution se determinó la posible toxicidad del péptido y la quimiocina en las células RAW 264.7 ATCC TIB-71. Dicho ensayo se basa en que el reactivo contiene un compuesto de tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, MTS] y un acoplador de electrones (Etosultafo de fenacina, PES). Cuando el MTS se reduce a un producto de formazan soluble en medio de cultivo por las células vivas, se puede leer su absorbancia a 490 nm; por lo que la absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas. Brevemente, aproximadamente  $1 \times 10^5$  células fueron incubadas en 600 µL de medio RPMI + SFB inactivado 10% por 24 h a 37°C y 5%

de CO<sub>2</sub>, posteriormente se agregaron diferentes concentraciones de Css54 o MCP-1 (desde 100 hasta 0.78 µg/mL) y se incubaron por 1 h. El medio se retiró y las células se lavaron con PBS frío. Se agregaron 580 µL de medio y 20 µL de solución acuosa (CellTiter 96®) y se incubó la placa por 1 h a las mismas condiciones. Finalizado el tiempo, 100 µL del sobrenadante fueron recolectados para medir su absorbancia a 490 nm.

### **6.13. Estimulación de fagocitosis**

Se analizó si la estimulación con péptido o quimiocina incrementa la capacidad de macrófagos para fagocitar bacterias. Para ello, en este ensayo se sembraron ≈100,000 células RAW 264.7 en una placa de 24 pozos con 600 µL de medio RPMI + SFB 10% y se incubaron por 24 h. Pasado este tiempo, se agregaron diferentes concentraciones del péptido Css54 o MCP-1, desde 12.5 hasta 0.78 µg/mL, y se incubaron durante 18 h. Tras ese tiempo, se recolectaron 200 µL de sobrenadante y se lavaron las células con PBS, se agregó *S. Typhimurium* con una D.O.= 0.04 en 600 µL de medio y se incubó por 40 min. Se recolectaron 200 µL de sobrenadante y se lavó la placa con 300 µL de ceftriaxona (0.006 mg/mL) para eliminar las bacterias presentes fuera de las células, se agregaron 400 µL de Triton 0.5% para lisar a las células y se recuperó el sobrenadante. Se centrifugaron las muestras a 7,000 rpm, 7 min y se decantó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 1 mL de PBS estéril y se tomaron 20 µL para colocarlos en un pozo con 180 µL de PBS para realizar diluciones 20:200, 20:4000. Se tomaron 10 µL de cada dilución y se sembraron por triplicado en placa de agar XLD para incubar por 24 h a 37°C y posteriormente se realizó el conteo de colonias.

### **6.14. Neutralización de LPS de *S. Typhimurium***

Para determinar si el péptido o la quimiocina tienen capacidad neutralizante de LPS se realizó el ensayo cromogénico de cuantificación de endotoxinas LAL (Thermo Scientific™ Pierce), el cual se basa en la activación de la enzima de coagulación presente en el lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL) cuando está en presencia de una endotoxina. La presencia de endotoxina cataliza la liberación de p-nitroanilina (pNA) presente en el sustrato cromogénico para producir un color amarillo; por lo tanto, la intensidad de color es directamente proporcional a la cantidad de endotoxina presente en la muestra, a menor absorbancia mayor neutralización. Para ello, se incubaron desde 6 hasta 0.18 µg/mL de Css54 o MCP-1 con ≈0.5 EU/mL de LPS de *S. Typhimurium* por 30 min a 37°C, en todos los casos. El grupo control solo contuvo 0.5 EU/mL de LPS y agua. Se siguieron las instrucciones del fabricante y finalmente se midió la absorbancia a

405 nm y se determinaron los niveles de endotoxina utilizando la curva estándar provista en el ensayo.

### **6.15. Inducción de sepsis en ratones**

El protocolo para el modelo de sepsis bacteriana fue aprobado con el No. 371 por el comité de bioética del Instituto de Biotecnología de la UNAM y se realizó bajo los requerimientos establecidos por el bioterio del mismo instituto, con base en la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999. Se utilizaron ratones de la línea Balb/C machos, de 20-23 gramos, fueron alojados en grupos de trabajo (n=3) en condiciones controladas de luz/oscuridad 12:12h, temperatura y humedad, con comida y agua *ad libitum*, en cuarto de nivel de bioseguridad animal 2. Para provocar la infección, *S. Typhimurium* ATCC 14028 fue inoculada en medio LB y se dejó incubar a 37°C por 18 h hasta alcanzar una D.O. de 1.2. Posteriormente, se tomó una alícuota de 10 µL, y se diluyó en 10 mL de PBS estéril, alcanzando una D.O. de 0.004 (equivalente a  $4 \times 10^6$  CFU) de la cual se tomaron 10 µL y se sembraron en agar XLD para contar las CFU a las 24 h (n=3). La dilución de 9.97 mL, repartida en viales de 1.5 mL, se centrifugó 1 min a 10,000 rpm, se descartó el sobrenadante y se concentró el pellet, el cual se resuspendió en 200 µL de PBS. Finalmente, cada ratón se inyectó intraperitonealmente con la solución bacteriana.

Después de 24 h de infección, cada grupo de ratones se trató con 200 µL de C54 15 µM, 200 µL de MCP-1 15 µM, o 400 µL de C54 15 µM + 15 µM de MCP-1 diluidos en PBS (en todos los casos), vía intraperitoneal.

### **6.16. Recuento de carga bacteriana**

Después 72 h de infección, los individuos fueron sacrificados por dislocación cervical y se realizaron lavados peritoneales a cada uno. Para ello, se inyectó 1 mL de PBS estéril al peritoneo y se recolectó en un tubo estéril. Se realizaron diluciones 1:10 y 1:100 y se sembraron 10 µL de cada muestra por triplicado en agar XLD. La placa se incubó por 24 h a 37°C y se realizó el recuento bacteriano.

Posteriormente, se extrajo hígado y bazo de cada individuo. Se agregó 1 mL de PBS y se maceró el órgano, después se realizó una dilución 1:10 y de ésta se sembraron 10 µL en agar XLD, específico para *Salmonella*. Se incubó por 24 h a 37°C y se realizó el recuento bacteriano en caso de crecimiento.

### **6.17. Análisis de citocinas por citometría de flujo**

Pasadas 72h de infección y tratamiento, se extrajeron de 100 a 200  $\mu\text{L}$  de sangre de cada individuo y se resuspendió con 50  $\mu\text{L}$  de solución  $\text{K}_2\text{EDTA}$  7.2 mg. Se centrifugó a 4,000 rpm por 2 min y se separó el plasma.

Las muestras fueron procesadas para ser analizadas por matriz de perlas citométricas para IL-12p70,  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$ , MCP-1, IL-10 e IL-6 (CBA, Mouse inflammation Kit- Becton Dickinson). Para ello, se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de muestra a 50  $\mu\text{L}$  de perlas de captura, posteriormente se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de anticuerpo para PE (Ficoeritrina) y se incubó por 2h a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se añadió 1 mL de buffer de lavado y se centrifugó a 200g por 5 min. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado para resuspender el pellet.

Finalmente, las muestras fueron examinadas en un citómetro acústico Attune Nxt (Thermofisher Scientific) con un flujo de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Los datos fueron analizados con el software FlowJo versión 10 (FlowJo, LLC).

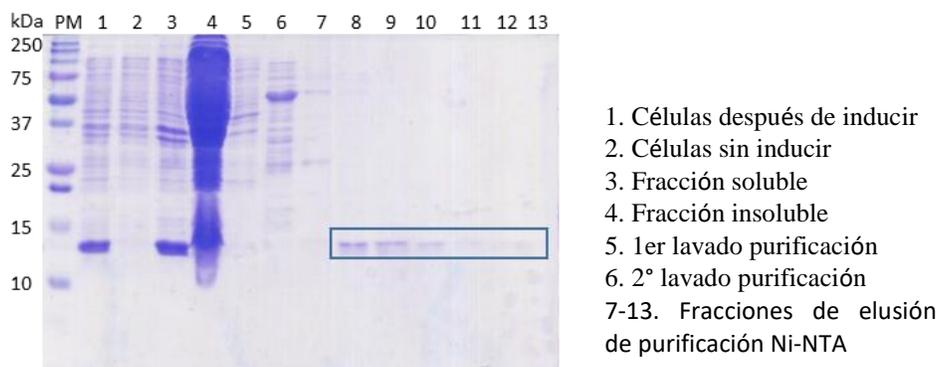
### **6.18 Análisis estadístico**

Para el análisis de los datos se utilizó el software GraphPad Prisma (GraphPad). Los datos en barras son mostrados como la media con su desviación estándar ( $\pm\text{SD}$ ). En el caso del análisis de peso, conteo bacteriano *in vivo* y análisis de expresión de citocinas se realizó un análisis ANOVA de los tratamientos contra el control.

## 7. Resultados

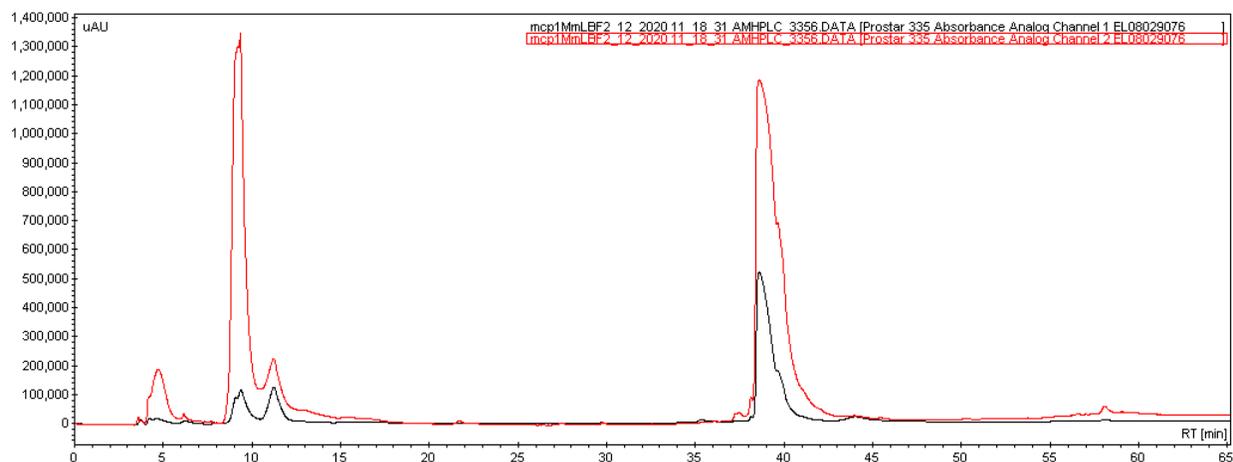
### 7.1. Obtención de MCP-1

Se expresó la quimiocina MCP-1 en células de *E. coli* Origami en diferentes medios de cultivo. La proteína se encontró en la fracción soluble e insoluble pero se decidió purificar por cromatografía de afinidad la fracción soluble recuperada a partir del medio MmLB por ser la de mejor rendimiento. Se esperaba un tamaño de 10,935.43 Da, incluyendo el tallo de histidinas, y se observaron bandas de un tamaño aparente de 14 kDa, esto se puede deber al número de cargas positivas (+14) y su punto isoeléctrico (9.36). En la figura 3 se muestran las bandas de expresión de las distintas fracciones obtenidas a partir de medio MmLB.



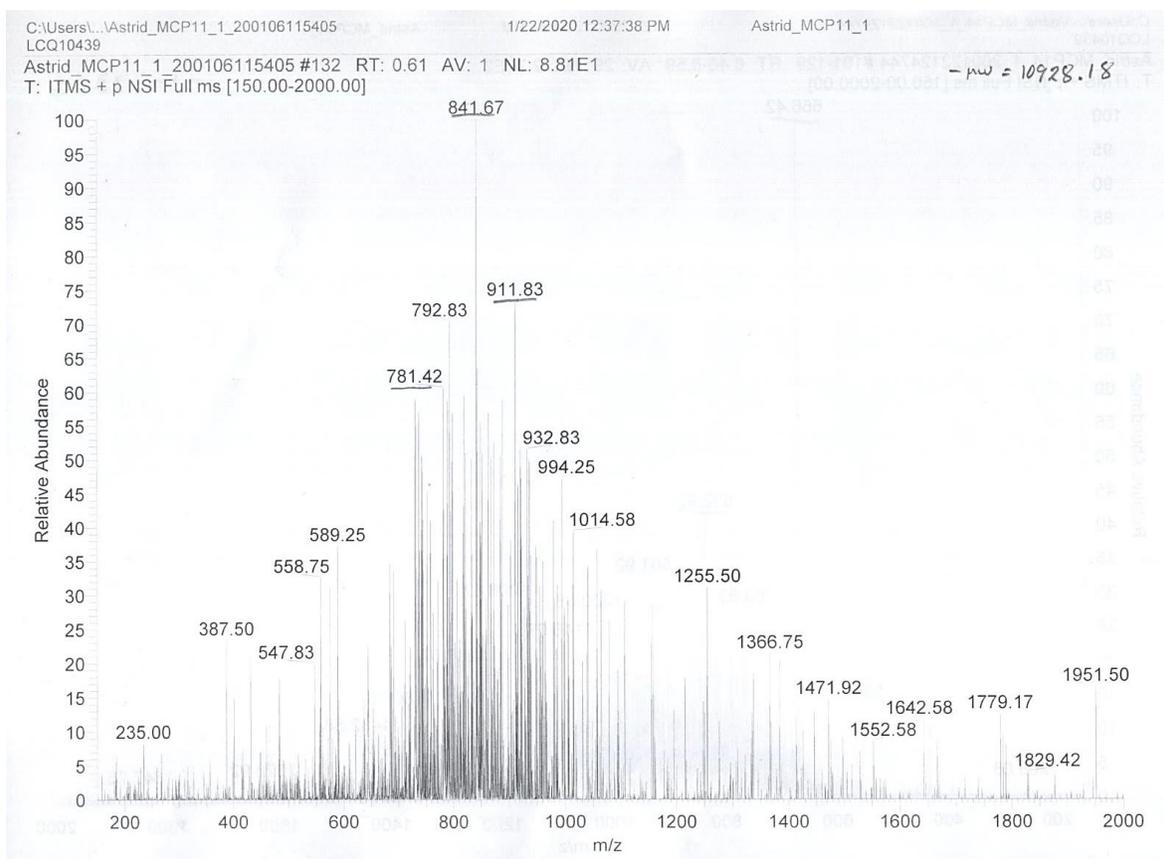
**Figura 3.** Gel SDS-PAGE 15% que muestra la expresión y purificación de MCP-1. Carriles 1 – 4: expresión de pQE30::MCP-1 en medio MmLB. Carriles 5 -13: purificación por cromatografía de afinidad.

Posteriormente, las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad se sometieron a un segundo paso de purificación por HPLC en fase reversa usando una columna C4. La proteína eluyó en un tiempo de retención de 37.8 min (Figura 4).



**Figura 4.** Purificación de MCP-1 por RP-HPLC. Columna C4 (4.6 x 250 mm). Gradiente 0-60 % B en 60 min, flujo 1 mL/min. Solvente A: H<sub>2</sub>O+0.1 %TFA; Solvente B: Acetonitrilo+0.1%TFA. Tiempo de retención de MCP-1: 37.8 min (32.8% de B). Los trazos representan la absorbancia a 230 (rojo) y 280 (negro) nm, respectivamente.

La fracción recolectada con tiempo de retención de 37.8 min se envió a análisis de masas moleculares y se obtuvo un peso molecular de 10,928.2 Da (Figura 5). La masa molecular teórica del péptido oxidado es de 10,931.4 Da y reducido de 10,935.4, con el tallo de histidinas, por lo tanto, se encuentra en forma oxidada. La diferencia de masa molecular esperada (10,931.4-10,928.2) de 3.2 unidades de masa atómica pueden deberse a un error de calibración del equipo o a que, ya que la proteína forma 2 puentes disulfuro, posiblemente uno de ellos no esté formado completamente.



**Figura 5.** Espectro de iones m/z de la fracción proteica de MCP-1 obtenida de la purificación por RP-HPLC. Se analizó la masa molecular de la fracción obtenida de MCP-1 por RP-HPLC y se obtuvo un peso de 10928.18 Da.

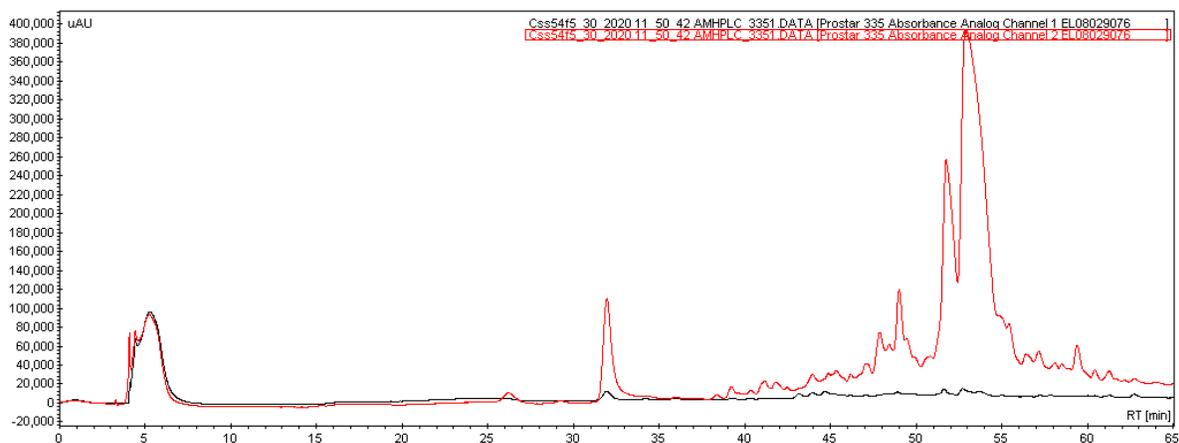
Durante la expresión de MCP-1 se probaron tres medios de cultivo diferentes, 2xYT, LB y MmLB, a las mismas condiciones de crecimiento para comparar el rendimiento de proteína obtenida. El medio óptimo para la expresión de la MCP-1 resultó ser MmLB con 640 µg/L, como se muestra en la tabla 3. Esto se puede deber a que en el momento de inducción con IPTG, el medio también es suplementado con glucosa, al existir una mayor densidad celular en el medio, se requieren más nutrientes y en especial la fuente de carbono para un óptimo crecimiento. Se ha comprobado que un incremento en la concentración de glucosa, normalmente de 0.4 a 1%, también incrementa la densidad celular y el rendimiento de proteína (Sivashanmugam et al., 2009), además de que ayuda a mitigar los problemas de aireación en cultivos con cepas derivadas de *E. coli* K-12 (Ukkonen, Mayer, Vasala, & Neubauer, 2013) como es el caso de Origami.

Tabla 3. Rendimiento de MCP-1 en diferentes medios de cultivo.

Medio	Rendimiento [ $\mu\text{g/L}$ ]
2xYT	40
LB	235
MmLB	640

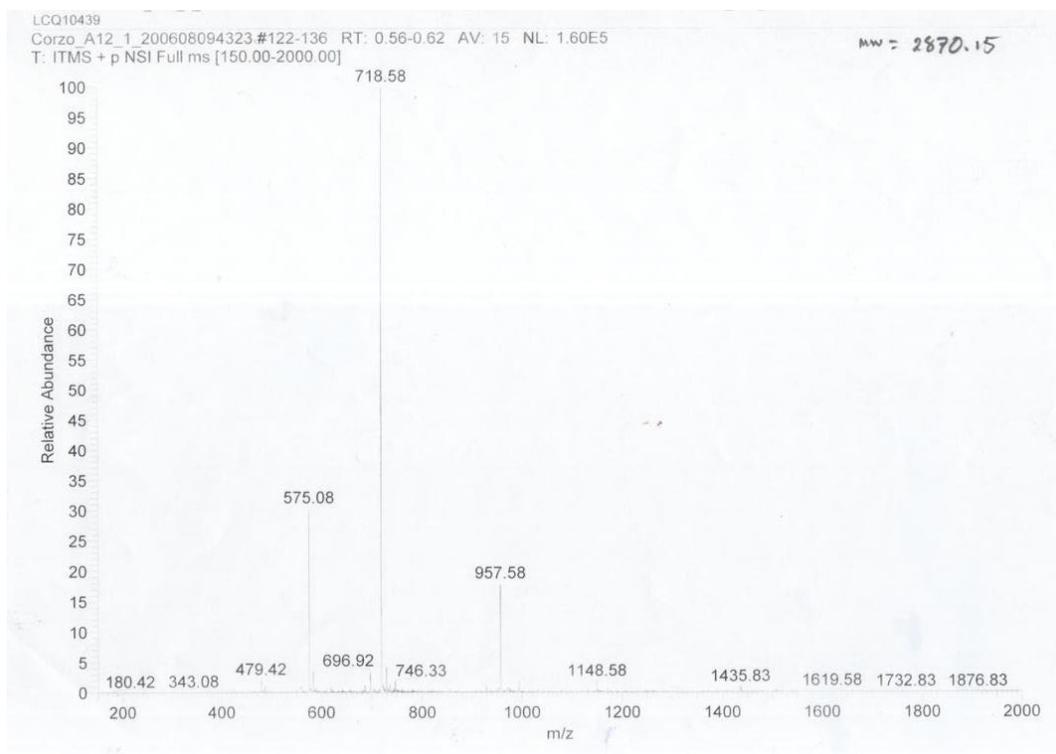
### 7.2. Purificación del péptido *Css54*

Al ser un péptido de origen sintético, se realizó su purificación por HPLC-RP, usando una columna C18. El péptido eluyó en un tiempo de retención de 52 min (47% de acetonitrilo+0.1%TFA) (Figura 6).



**Figura 6.** Purificación de *Css54*. Se utilizó una columna C18 (4.6 x 250 mm) con un gradiente 0-60%B en 65 min, flujo 1 mL/min. Solvente A:  $\text{H}_2\text{O}+0.1\%$  TFA; Solvente B: Acetonitrilo+0.1%TFA. Tiempo de retención de *Css54*: 52 min (47% de B).

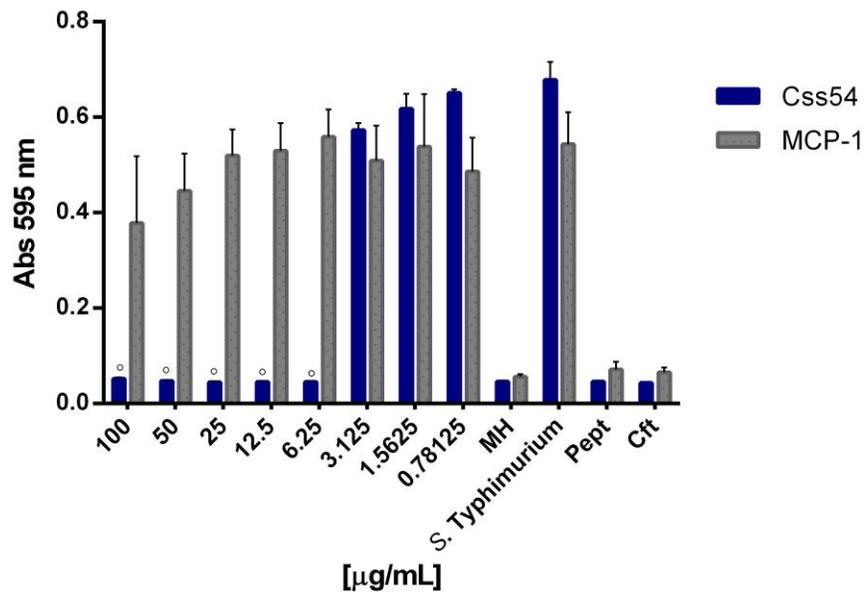
La fracción recolectada en ese tiempo de retención se envió a análisis de masas moleculares y se obtuvo un peso de 2,870.15 Da (Figura 7). La masa molecular teórica del péptido es de 2,870.4 Da.



**Figura 7.** Espectro de iones m/z de la fracción proteica obtenida a los 52 min de la purificación por RP-HPLC de C554. Se obtuvo una masa molecular de 2870.15 Da, la masa teórica es de 2870.4 Da.

### 7.3. Concentración mínima inhibitoria

Previamente García et al. (2013) demostraron que la MIC de C554 para *S. aureus* y *E. coli* fue de 12.5 µg/mL, por lo que se probaron concentraciones entre 0.7 y 100 µg/mL del péptido C554 y MCP-1 en células de *S. Typhimurium* ATCC 14028 para determinar su posible actividad antimicrobiana mediante ensayo de microdilución seriada. C554 demostró inhibir el crecimiento bacteriano a una concentración de 6.25 µg/mL, mientras que MCP-1 no presentó actividad antibacteriana, aunque sí se observó una disminución en el crecimiento respecto al control a una concentración de 50 µg/mL pero sin ser estadísticamente significativo (Figura 8).

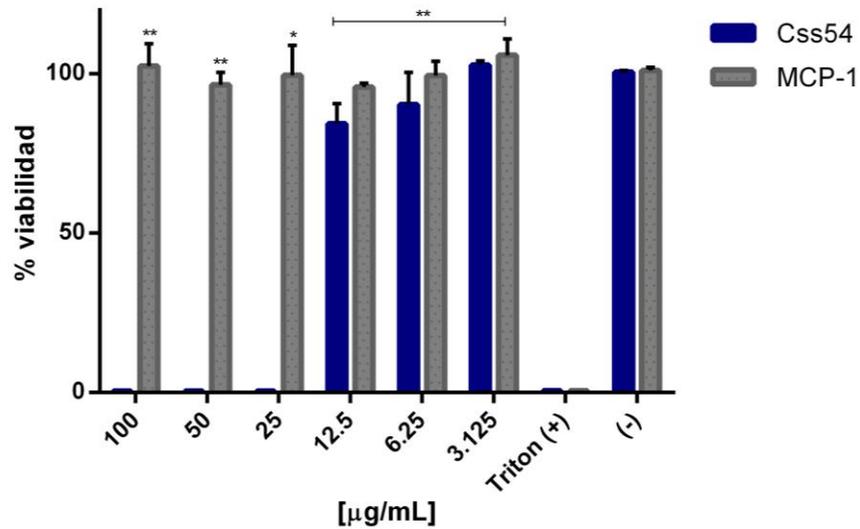


**Figura 8.** Concentración mínima inhibitoria de Css54 y MCP-1. Se incubaron diferentes concentraciones del péptido y la quimiocina con  $1 \times 10^8$  células de *S. Typhimurium* ATCC 14028 en caldo Mueller-Hinton (MH) ( $n=3$ ). MH: caldo sin bacteria; *S. Typhimurium*; Pept: Css54 o MCP-1 [ $0.39 \mu\text{g/mL}$  c/u] + medio de cultivo MH; Cft: bacteria + ceftriaxona [ $100 \mu\text{g/mL}$ ]. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes, por triplicado.  $P = \circ < 0.0001$

Por otro lado, a partir de la MIC se determinó que la concentración bactericida mínima (MBC) del péptido Css54 contra *S. Typhimurium* es de  $25 \mu\text{g/mL}$ . Por lo tanto, de acuerdo con el criterio de French et al. 2006, en donde se establece que la concentración mínima de péptido que evita el crecimiento bacteriano representa la MBC y si la MBC es menor a cuatro veces la MIC, el péptido tiene un efecto bactericida.

#### 7.4. Citotoxicidad

Como el péptido Css54 o MCP-1 podrían presentar toxicidad en los macrófagos, fue necesario determinar a qué concentración se podría generar dicho daño. Se probaron concentraciones desde 100 hasta  $3.125 \mu\text{g/mL}$  de Css54 o MCP-1. Los resultados indican que el péptido es tóxico para las células a partir de concentraciones mayores a  $12.5 \mu\text{g/mL}$ , mientras que la MCP-1 no provoca ningún daño, como se muestra en la figura 9.

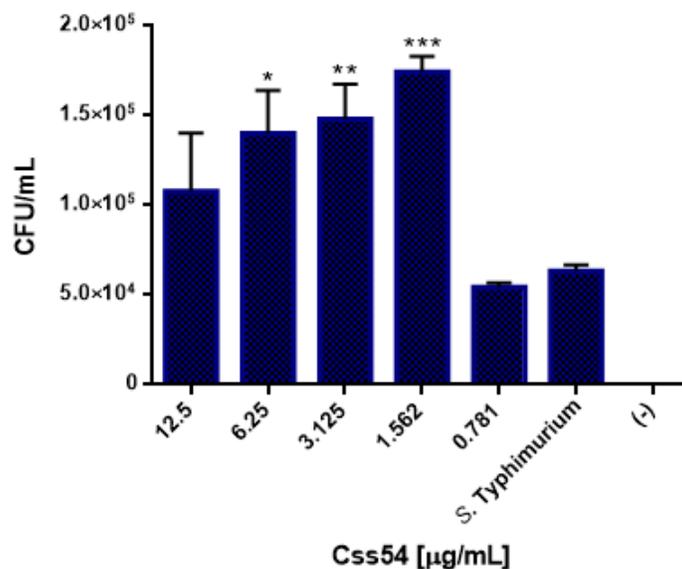


**Figura 9.** Efecto de los péptidos Css54 y MCP-1 sobre la viabilidad de las células RAW 264.7. Células RAW 264.7 fueron tratadas con diferentes concentraciones del péptido Css54 o MCP-1 e incubadas por 1h. (+): células tratadas con Triton 1% y sin Css54 o MCP-1; (-): células sin péptido. La figura muestra el promedio de tres experimentos independientes por triplicado.

A partir de estos resultados, se decidió continuar con los análisis *in vitro* utilizando una concentración máxima de 12.5 µg/mL de Css54 y MCP-1.

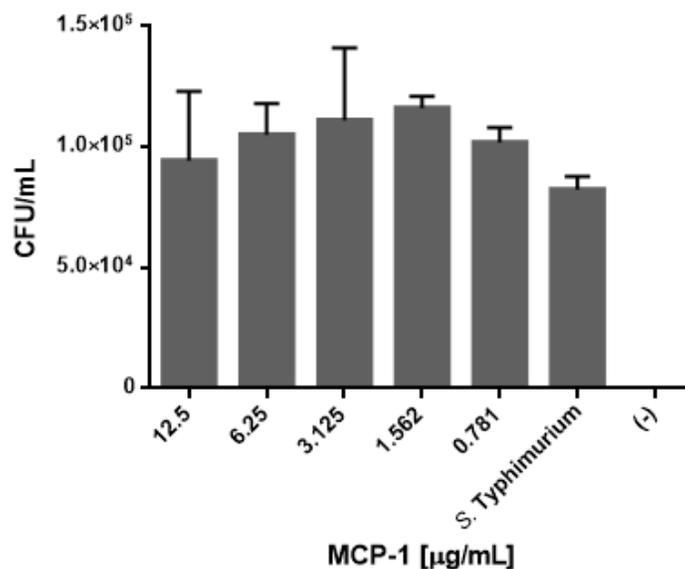
### 7.5. Fagocitosis

Debido a que la fagocitosis es una de las actividades principales de los macrófagos cuando se encuentran en contacto con un patógeno, se examinó si el péptido Css54 tiene un efecto en dicha actividad en la línea celular RAW 264.7. Se probaron diferentes concentraciones desde 12.5 hasta 0.78 µg/mL de Css54 y en la mayoría de los casos se observa un incremento en la actividad fagocítica de *S. Typhimurium* respecto al control (Figura 10), con un máximo a 1.562 µg/mL.



**Figura 10.** Efecto de Ccss54 sobre la actividad fagocítica de células RAW 264.7. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de péptido (12.5-0.78 µg/mL) por 18 h e infectadas con *S. Typhimurium* por 40 min para evaluar su actividad fagocítica (n=3). *S. Typhimurium*: células infectadas y sin péptido; Control (-): células sin bacteria.

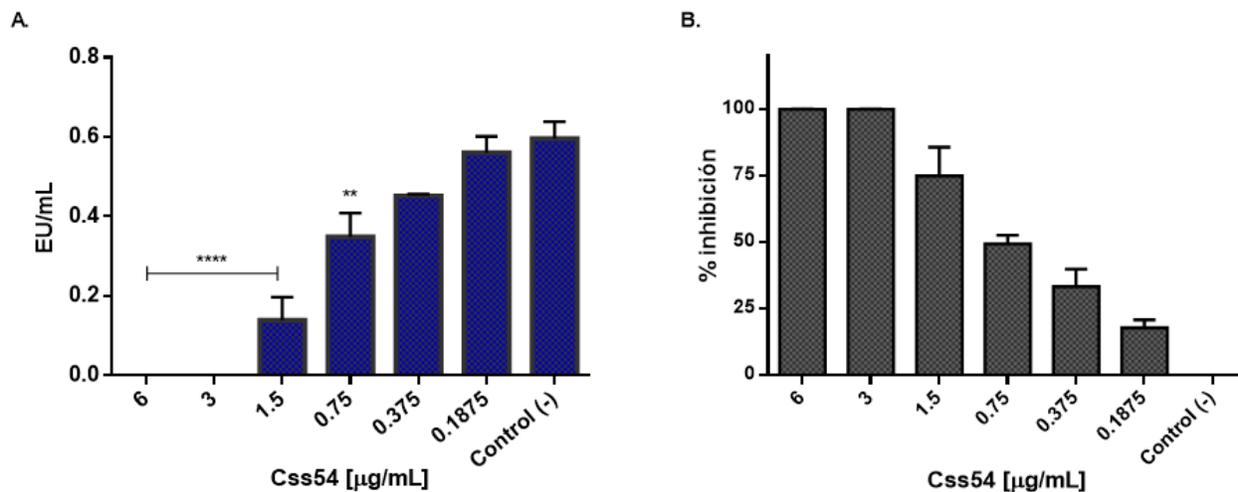
También se analizó si la MCP-1 tiene efecto en la actividad fagocítica, para lo cual se probaron las mismas concentraciones de la quimiocina, de 12.5 hasta 0.78 µg/mL de MCP-1. Como se observa en la figura 11, en todas las concentraciones se da un incremento aparente de actividad respecto al control, con un máximo a 1.562 µg/mL de MCP-1 aunque no resulta ser significativo.



**Figura 11.** Efecto de MCP-1 sobre la actividad fagocítica de células RAW 264.7. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de la quimiocina (12.5-0.78 μg/mL) por 18 h e infectadas con *S. Typhimurium* por 40 min para evaluar su actividad fagocítica. *S. Typhimurium*: células infectadas y sin quimiocina; Control (-): células sin bacteria. (n=3)

### 7.6. Neutralización de LPS

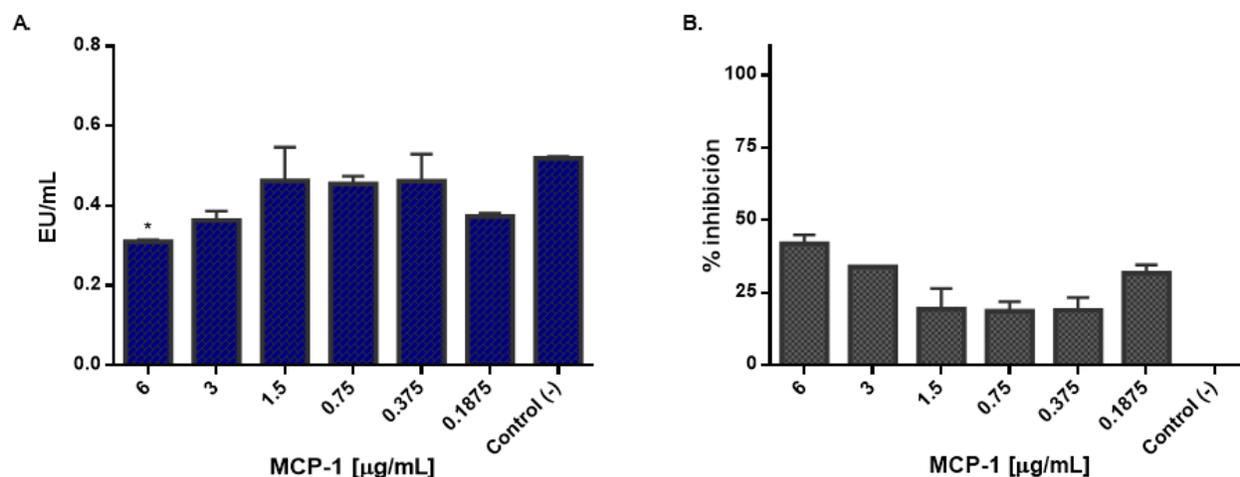
Se realizó el ensayo LAL para medir la habilidad de Css54 de neutralizar LPS de *S. Typhimurium*, ya que los LPS son uno de los principales agentes causantes de inflamación. En la figura 12 se muestran los niveles de endotoxina (EU) detectados respecto a la concentración de péptido: se puede observar que el péptido neutraliza LPS de manera dosis-dependiente.



**Figura 12.** Neutralización de LPS de *S. Typhimurium* por el péptido Css54. Se incubaron diferentes concentraciones de 6 hasta 0.18 μg/mL de Css54 con ≈0.5 EU/mL de LPS de *S. Typhimurium* por 30 min. A. Unidades de endotoxina (EU) por mL respecto a concentración de Css54; B. Porcentaje de inhibición que se logra al incubar el péptido con LPS. Control (-): LPS + agua. (n=3)  $P =$ , \*\* < 0.005, \*\*\*\* < 0.0001

A partir de la determinación de EU/mL se calculó el porcentaje de neutralización de LPS que presenta el péptido. En la figura 12-B se puede observar que se tiene un 100% de inhibición a partir de concentración de 3 μg/mL, aunque aún sigue presentando actividad a concentraciones muy bajas como 0.1875 μg/mL (con un 17.8% de inhibición), lo que sugiere una gran afinidad del Css54 por los LPS.

Se realizó el mismo ensayo para determinar si MCP-1 presenta actividad neutralizante. En la figura 13 se muestra que si bien, MCP-1 no neutraliza completamente el LPS, reduce los niveles de endotoxina respecto al control (figura 13-A).



**Figura 13.** Neutralización de LPS de *S. Typhimurium* por el MCP-1. Se incubaron concentraciones de 6 hasta 0.18 µg/mL de MCP-1 con ≈0.5 EU/mL de LPS de *S. Typhimurium* por 30 min (n=3). A. Unidades de endotoxina (EU) por mL respecto a concentración de MCP-1; B. Porcentaje de inhibición que se logra al incubar la quimiocina con LPS. Control (-): LPS + agua.  $P = * < 0.05$ .

En la figura 13-B se observa el porcentaje de inhibición de LPS que se logra con el tratamiento, con un máximo de 44% a 6 µg/mL. A ninguna concentración se presentó un 100% de inhibición con esta proteína.

### 7.7. Inducción de sepsis en modelo murino

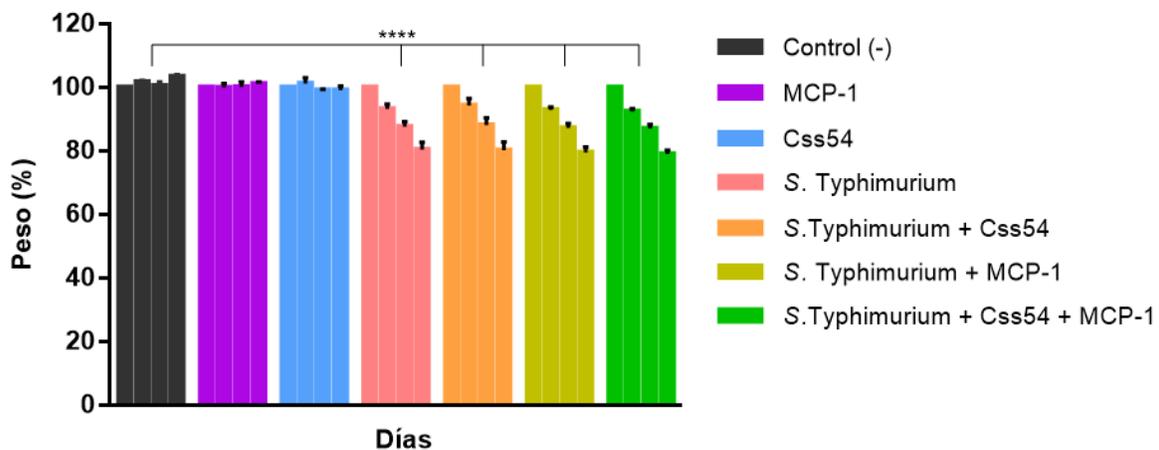
El primer paso para determinar el perfil de expresión de citocinas en ratones con sepsis por *S. Typhimurium* fue la estandarización de la infección. Se probaron dos diluciones de un concentrado de *S. Typhimurium* con una D.O = 1.2 y se monitorearon a los ratones a diferentes horas. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Infección de ratones con diferentes D.O. de *S. Typhimurium*.

Dilución	D.O.	# bacterias	Horas	Pérdida de peso
0.005	0.016	$1.3 \times 10^7$	48	4.3 - 4.6 g
0.001	0.004	$4 \times 10^6$	96	5.9 - 6.3 g

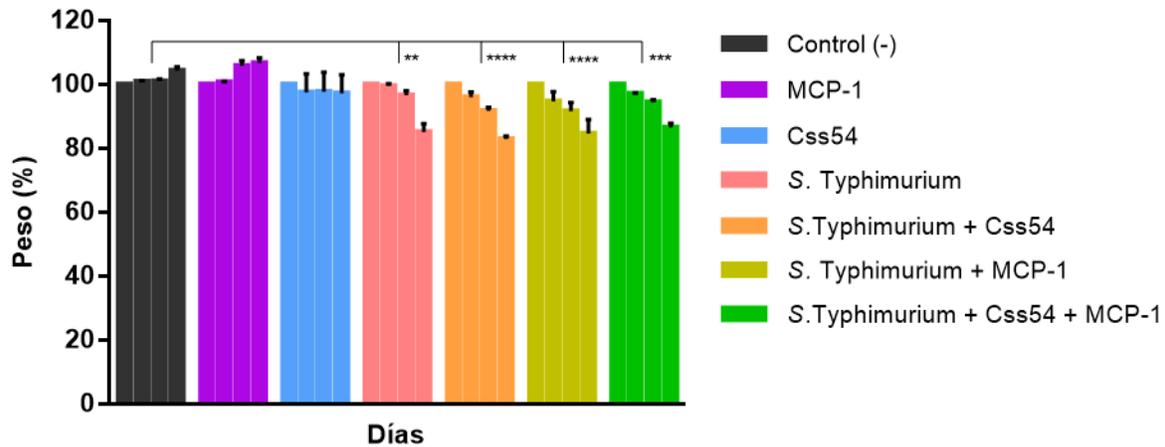
Debido a que el experimento tiene una duración de 72 h, se eligió infectar a los ratones con una dilución del concentrado de 0.001, la cual tuvo una D.O. de 0.004, y un conteo bacteriano de  $4 \times 10^6$  CFU/mL, ya que el tiempo máximo de supervivencia fue de 96 h (tabla 4) y aunque aparentemente hubo una mayor pérdida de peso, se debe a que la infección tuvo una duración más larga. Se ha reportado que en ratones Balb/c de 18 a 25g con una inoculación intraperitoneal a partir de  $10^5$  CFU de *S. Typhimurium*, se presenta una condición de sepsis a las 24h (Gautam et al., 2016), por lo que al estar infectando con una cantidad mayor se asegura la inducción de la patología.

Se trataron a los diferentes grupos con 200  $\mu$ L de Css54 15  $\mu$ M, 200  $\mu$ L de MCP-1 15  $\mu$ M, o 400  $\mu$ L de Css54 15  $\mu$ M + 15  $\mu$ M de MCP-1 diluidos en PBS (en todos los casos), a las 24 y 48 h de infección. Se monitoreó el peso de todos los grupos y se puede observar que los grupos infectados con la bacteria pierden significativamente ( $p < 0.0001$ ) hasta un 23% de sus pesos en promedio al final del experimento (hasta 1.4 g por día) mientras que los grupos control mantienen su peso (Figura 14).



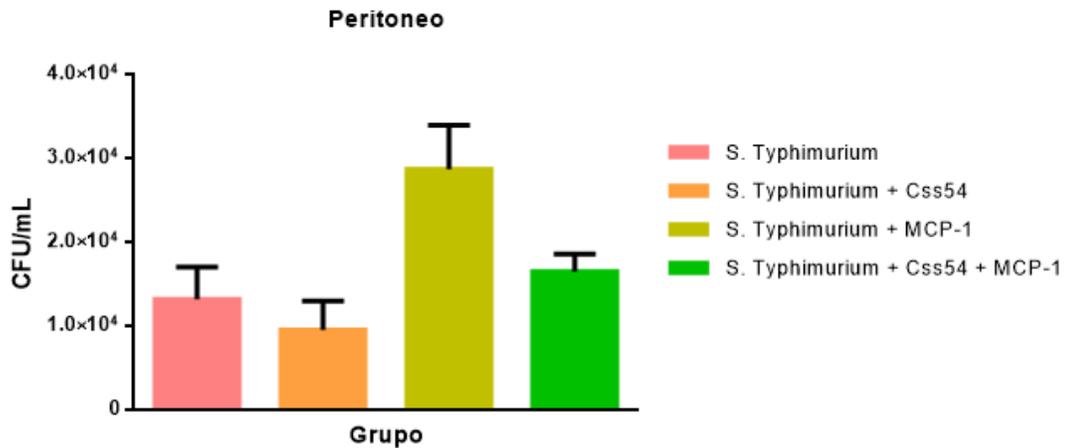
**Figura 14.** Control de peso de ratones con sepsis, 2 tratamientos. Ratones Balb/c fueron infectados con *S. Typhimurium* ( $\approx 4 \times 10^6$  CFU) y tratados con Css54, MCP-1 o Css54 y MCP-1 (15  $\mu$ M en todos los casos) a las 24 y 48h después. Las barras representan los días transcurridos del 1 al 4. Control (-): PBS. n=6.  $P = **** < 0.0001$ .

Por otra parte, se trataron a los diferentes grupos con 15  $\mu\text{M}$  de C<sub>ss</sub>54, 15  $\mu\text{M}$  de MCP-1 o 15  $\mu\text{M}$  de C<sub>ss</sub>54 + 15  $\mu\text{M}$  de MCP-1 únicamente 24 h después de la infección. De la misma manera se monitoreó el peso de todos los grupos y en aquellos infectados con la bacteria observamos que pierden significativamente hasta el 21.7% en promedio al final del experimento ( $p < 0.05$ ), se puede observar que la pérdida abrupta de peso se da al último día, mientras que los grupos control aumentan ligeramente su peso (Figura 15).



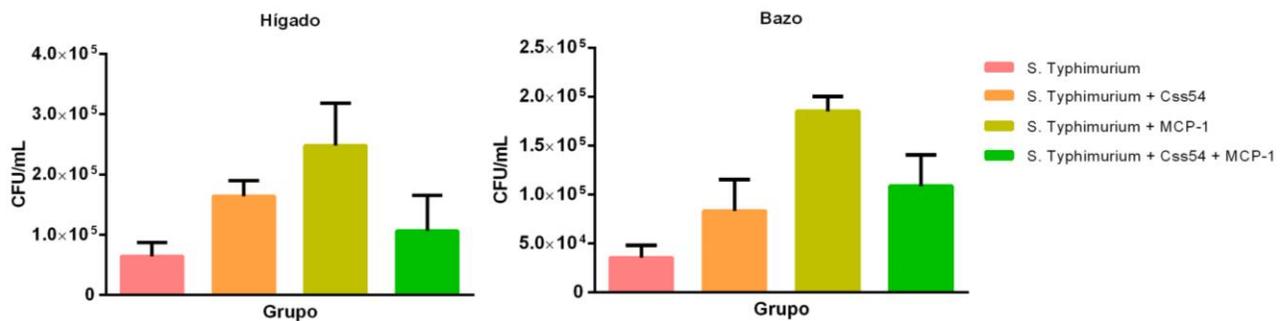
**Figura 15.** Control de peso de ratones con sepsis, 1 tratamiento. Ratones Balb/c fueron infectados con *S. Typhimurium* ( $\approx 4 \times 10^6$  CFU) y tratados con C<sub>ss</sub>54, MCP-1 o C<sub>ss</sub>54 y MCP-1 (15  $\mu\text{M}$  en todos los casos) a las 24 h. Las barras representan los días transcurridos del 1 al 4 (72 h en total). Control (-): PBS.  $n=6$ .  $P = ** < 0.01$ ,  $*** < 0.001$ ,  $**** < 0.0001$ .

Por otro lado, se verificó si hay una reducción de la carga bacteriana en hígado y bazo, así como en peritoneo luego de la administración de los tratamientos. Los resultados muestran que en el peritoneo se da una reducción muy pequeña de la carga bacteriana en el grupo tratado con el péptido C<sub>ss</sub>54, aunque no resulta ser significativo, mientras que con MCP-1 y la combinación de ambos péptidos, la carga aumenta respecto al control (Figura 16).



**Figura 16.** Recuento bacteriano en peritoneo. Ratones Balb/c fueron infectados con *S. Typhimurium* ( $\approx 4 \times 10^6$  CFU) y tratados con Css54, MCP-1 o Css54 y MCP-1 ( $15 \mu\text{M}$  en todos los casos) a las 24 h. Se realizó el conteo bacteriano en peritoneo a las 72 horas ( $n=6$ ). Se muestra el resultado de dos experimentos independientes.

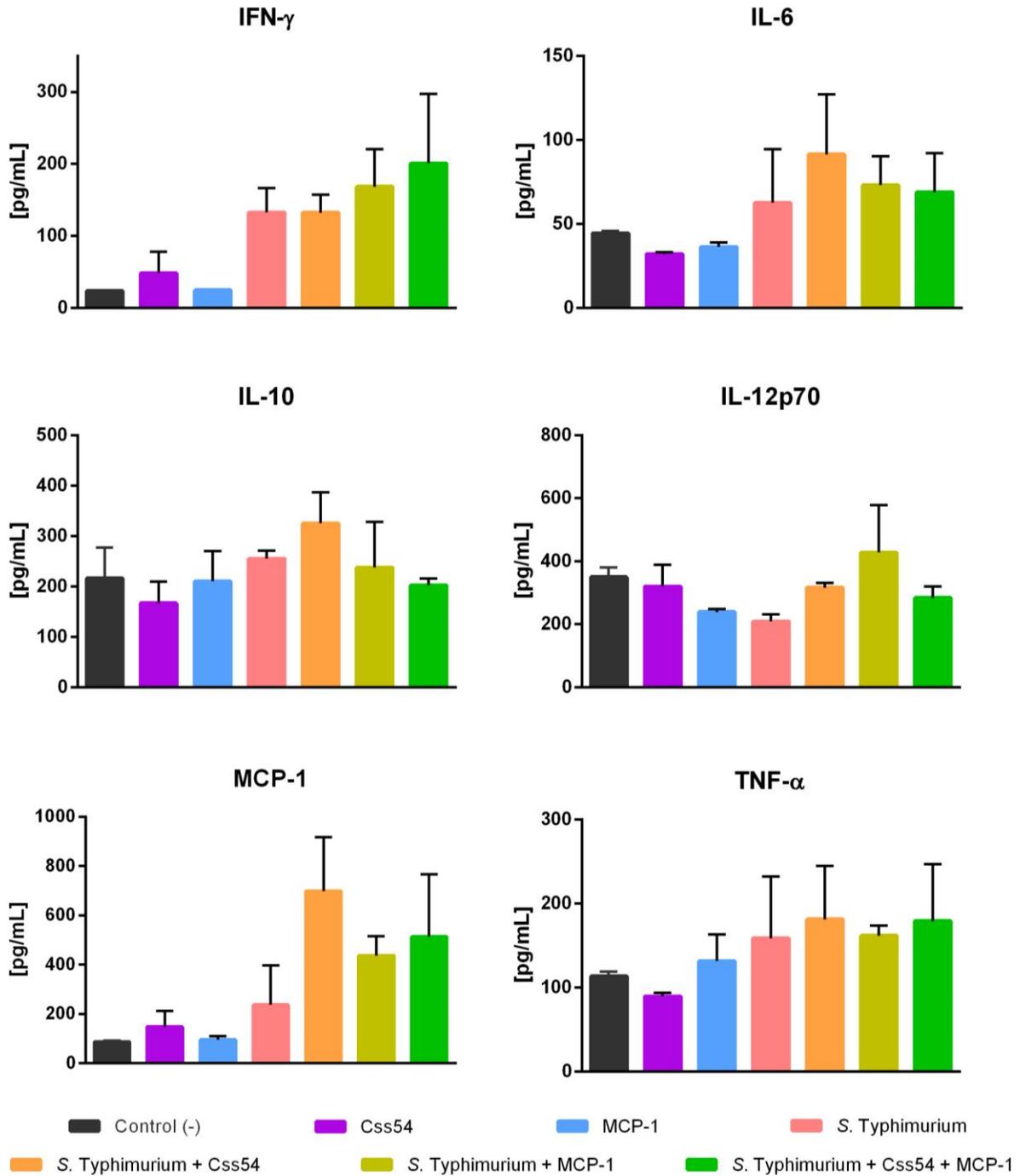
En el caso de hígado y bazo, los grupos tratados con Css54 o MPC-1 no muestran una reducción de carga bacteriana, al contrario, se da un aumento respecto al control (Figura 17).



**Figura 17.** Recuento bacteriano en hígado y bazo. Ratones Balb/c fueron infectados con *S. Typhimurium* ( $\approx 4 \times 10^6$  CFU) y tratados con Css54, MCP-1 o Css54 y MCP-1 ( $15 \mu\text{M}$  en todos los casos) a las 24 h. Se realizó el conteo bacteriano en órganos a las 72 horas ( $n=6$ ). Se muestra el resultado de dos experimentos independientes.

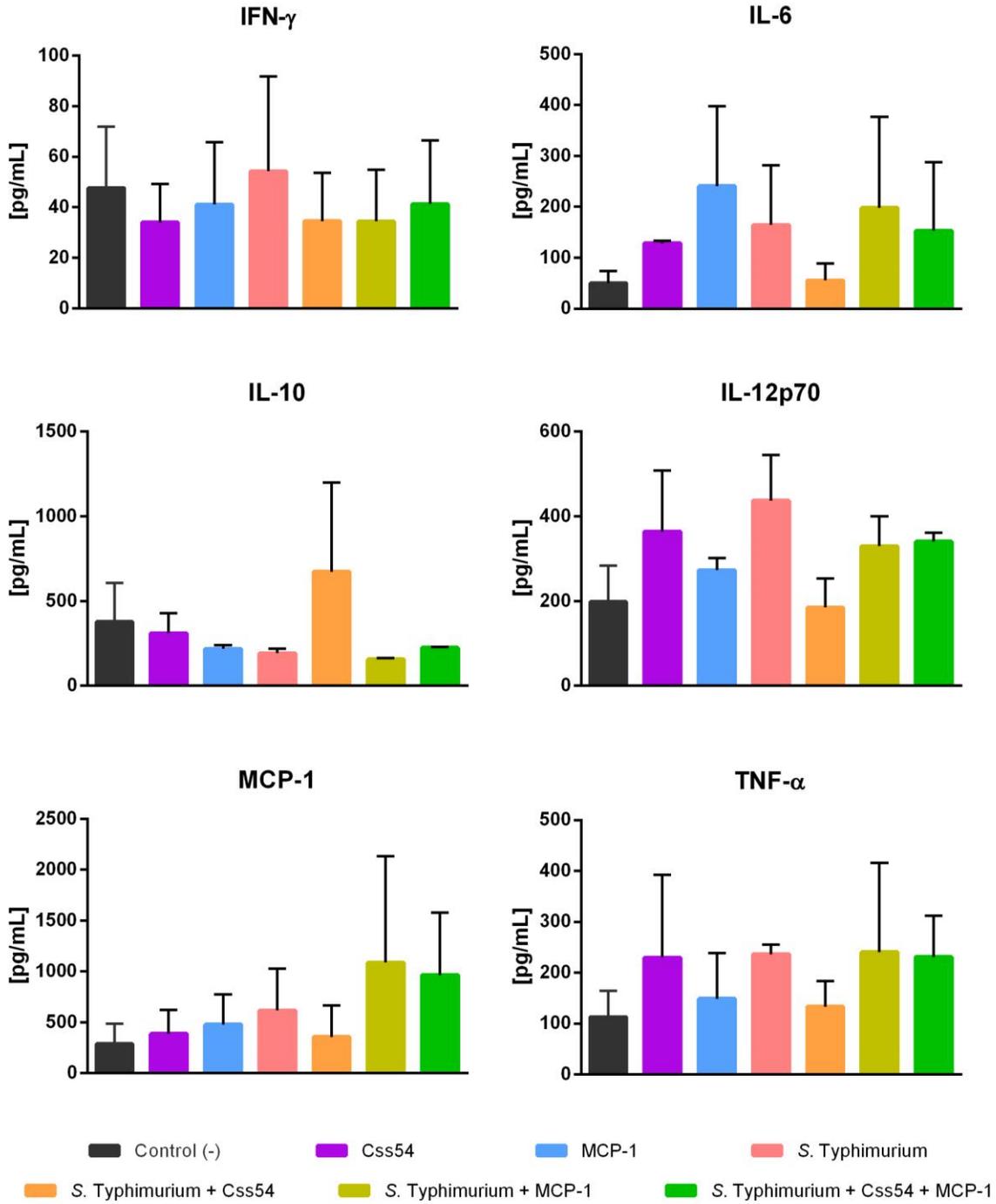
### ***7.8. Análisis de expresión de citocinas en modelo murino de sepsis***

Se analizó la expresión de diferentes citocinas en plasma sanguíneo de ratones infectados con *S. Typhimurium* ( $4 \times 10^6$  CFU/ratón) y tratados a diferentes horas. Se establecieron grupos tratados 24 h después de la infección, y grupos tratados 24 y 48 h después de la infección debido a que en este último se trató de dilucidar qué pasaría si el péptido fuera utilizado como un antibiótico cada 24 h. Todos ellos con Css54 15  $\mu$ M, MCP-1 15  $\mu$ M o la combinación de ambos a 15  $\mu$ M. En el caso de un solo tratamiento a las 24 h de infección, los resultados muestran que con el tratamiento de Css54, los niveles de todas las citocinas incrementaron a excepción de IFN- $\gamma$  que se mantiene respecto al control infectado y sin tratar. Mientras que, cuando se trataron a los individuos con MCP-1, citocinas con perfil proinflamatorio como IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-12p70 aumentaron sus niveles, pero la citocina con perfil antiinflamatorio, IL-10, se vio disminuida lo que sugiere que MCP-1 podría asociarse con un perfil proinflamatorio. Ese mismo comportamiento se observa cuando se trataron a los individuos con la combinación de péptido y quimiocina (Figura 18).



**Figura 18.** Expresión de citocinas en ratones infectados con *S. Typhimurium* y tratados con Css54, MCP-1 o Css54+MCP-1 a las 24 h. Plasma de ratones Balb/C fue extraído a las 72 h de infección y analizado por citometría de flujo a una velocidad de 100  $\mu$ L/min. Css54: 15  $\mu$ M; MCP-1: 15  $\mu$ M; Css54 + MCP-1: 15 15  $\mu$ M; Control (-): PBS. Cada gráfico muestra el resultado de dos experimentos independientes con triplicados (n=6).

En cambio, cuando se trataron a los grupos de ratones cada 24 h (dos tratamientos en total), se puede observar que, en el grupo tratado con C54 existe una disminución de IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12p70, MCP-1 y TNF- $\alpha$  respecto al control infectado y además aumenta el nivel de IL-10, sugiriendo que el péptido podría tener efecto antiinflamatorio. En el caso de MCP-1, aparentemente se aumentan los niveles de IL-6 pero existe una disminución de IFN- $\gamma$ , IL-12p20 e IL-10 lo que podría indicar que la quimiocina está actuando como un regulador de la inflamación. Mientras que, el grupo tratado con la combinación de péptidos, disminuye la expresión de citocinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$ , IL-12p20, y mantiene los niveles de IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$  casi al nivel del control infectado, sin alterar la expresión. (Figura 19).



**Figura 19.** Expresión de citocinas en ratones infectados con *S. Typhimurium* y tratados con Css54, MCP-1 o Css54+MCP-1 a las 24 y 48 h. Plasma de ratones Balb/C fue extraído a las 72 h de infección y analizado por citometría de flujo a una velocidad de 100  $\mu$ L/min. Css54: 15  $\mu$ M; MCP-1: 15  $\mu$ M; Css54 + MCP-1: 15 15  $\mu$ M; Control (-): PBS. Cada gráfico muestra el resultado de dos experimentos independientes con triplicados (n=6).

## 8. Discusión

El péptido C55 demostró tener actividad antimicrobiana contra *S. Typhimurium* mientras que la quimiocina no inhibió el crecimiento (Figura 8). En el caso de C55, García *et al.* (2013) determinaron una MIC de 12.5 µg/mL contra *E. coli* y *S. aureus*, en este trabajo la MIC para *S. Typhimurium* fue menor con un valor de 6.25 µg/mL. Probablemente esto se deba a que al ser una bacteria Gram- negativa existe una composición diferente en la membrana celular, provista de LPS, que al estar cargados negativamente pueden interactuar de manera eficiente con los AMPs cargados positivamente. En el caso de las Gram- positivas, carecen de una segunda membrana o LPS pero están enriquecidas de ácido teicoico cargado negativamente (Yeaman & Yount, 2003). Además, se sabe que la membrana externa de las bacterias Gram-negativas es asimétrica, compuesta principalmente por lípido A, el cual presenta una enorme variabilidad estructural debido a que se compone por una cabeza con grupo disacárido, de 0 a 2 grupos fosfato cargados negativamente, y de 4 a 7 colas alifáticas que varían en longitud y saturación; por ello la estructura y composición del lípido A puede servir como una forma de identificación bacteriana (Liang *et al.*, 2019; Nelson, Opene, Ernst, & Schwartz, 2020). Nelson *et al.*, 2020 demostraron que los AMPs que interactúan con mayor fuerza con el lípido A de la membrana bacteriana requieren menores dosis para impartir su efecto inhibitorio y viceversa (Nelson *et al.*, 2020) por lo que C55 podría estar interactuando con mayor afinidad con el lípido A de *S. Typhimurium* que con otras bacterias Gram-negativas.

En el caso de MCP-1, no se observó un efecto antimicrobiano. Esto se puede deber a que usualmente, las quimiocinas que presentan esa actividad forman un “parche” de cargas electrostáticas positivas en su superficie y en MCP-1 la formación de tal parche se ve interrumpida por residuos aniónicos (Yang *et al.*, 2003). Estos resultados corroboran los efectos observados por Yang *et al.*, 2003 con Gram negativas, donde MCP-1 no presentó efecto antimicrobiano contra *E. coli* a una concentración de 10 µg/mL. Se ha demostrado que esta quimiocina tampoco tiene efecto contra Gram positivas ni parásitos como *S. aureus* y *Leishmania mexicana*, respectivamente (Söbirk *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2003).

Una de las propiedades importantes de los AMPs es que tienen la habilidad de eliminar a las bacterias sin causar una toxicidad significativa a las células eucariotas. Los resultados muestran que C55 no causa citotoxicidad en células de macrófago RAW 264.7, a concentración máxima

de 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mientras que MCP-1 no causa daño incluso a concentraciones altas de 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 9);esto indica que ambos son péptidos viables en células de este tipo.

Los macrófagos eliminan a las bacterias directamente a través de la fagocitosis o indirectamente liberando moléculas inflamatorias y óxido nítrico (NO), así como secretando factores proinflamatorios como IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Wang et al., 2019). De acuerdo con los resultados, C54 demostró incrementar la actividad fagocítica de los macrófagos contra *S. Typhimurium*, incluso a concentraciones pequeñas (Figura 10). Diversos reportes han demostrado que los AMPs pueden activar las funciones de los macrófagos, la catelicidina LL-37 eleva la fagocitosis bacteriana por macrófagos humanos a bajas concentraciones del péptido (Wan et al., 2014), mientras que la sublancina (un AMP producido por *B. subtilis*) mejora la actividad fagocítica contra *S. aureus in vitro e in vivo* (Wang et al., 2019), así como HD5 (Human  $\alpha$ -defensin 5) que facilita la internalización de *Shigella* y *Salmonella* en macrófagos por medio de la promoción de adhesión bacteriana (Xu et al., 2019). Por otro lado, las quimiocinas pueden ejecutar diferentes funciones dependiendo del estímulo. Se sabe que CYTL1 promueve la fagocitosis de *E. coli* e induce la quimiotaxis en neutrófilos (Xue et al., 2020) y aunque no existe evidencia de que las quimiocinas tipo CC (como es el caso de MCP-1) promuevan la actividad fagocítica en macrófagos, en este trabajo se observó por primera vez que el tratamiento con MCP-1 resultó en el incremento aparente de dicha actividad (Figura 11).

Debido a que el tratamiento contra infecciones con antibióticos promueve la liberación de factores patógenicos como los LPS y por lo tanto resulta en sepsis bacteriana, un tratamiento efectivo debería combinar una gran actividad antimicrobiana con la habilidad de unión y neutralización de LPS. Los AMPs se han convertido en una alternativa ya que son capaces de interactuar con los LPS de dos formas, una se debe a la formación de atracciones electrostáticas entre las cargas positivas del péptido con los grupos fosfato de los LPS cargados negativamente, otra es la interacción hidrofóbica entre ellos (Gustafsson, Olin, & Ljunggren, 2010). Los resultados demuestran que el C54 muestra una gran habilidad de neutralización incluso a concentraciones menores de 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 12). Esto se puede deber a su gran cantidad de residuos cargados positivamente e hidrofóbicos. Se ha sugerido que la interacción entre péptidos y LPS puede deberse a la unión de los residuos catiónicos a los grupos fosfato de los LPS y la porción de lípido A, como ocurre con el LF12 (un péptido derivado de la Lactoferrina) y Mel4 (un péptido híbrido de la

Melitina) (Yasir et al., 2018). Además, se ha observado que al reemplazar residuos hidrofílicos por aminoácidos hidrofóbicos incrementa la habilidad de unión a los LPS (Rosenfeld, Lev, & Shai, 2010), por lo que el C<sub>ss</sub>54 al tener casi un 50% de residuos hidrofóbicos tiene una gran capacidad teórica de unión, por lo que sería interesante realizar un modelado *in silico* para confirmar esta interacción. Por otro lado, MCP-1 no mostró una gran capacidad de neutralización de LPS (Figura 13), ya que a la mayor concentración de 6 µg/mL solo se presentó un 44% de neutralización. Sin embargo, es el primer trabajo que reporta una interacción de LPS con quimiocinas.

Algunos AMPs han demostrado reducir los niveles de crecimiento bacteriano en órganos como pulmón, hígado y riñón en modelo murino, y, por lo tanto, asegurando la supervivencia de los individuos (Kim et al., 2019). En este caso, el tratamiento con C<sub>ss</sub>54, MCP-1 o la combinación de ambos, no logró reducir la carga bacteriana en peritoneo (Figura 16), hígado o bazo (Figura 17). Lo cual también explicaría la gran pérdida de peso de los individuos a diferentes horas de tratamiento (Figura 14-15), ya que la bacteria se estaría multiplicando de manera considerable en todo el organismo. Esto sugiere que, si bien el AMP y la quimiocina mostraron neutralización de LPS *in vitro*, no se asegura que en un modelo *in vivo* estén interactuando; lo cual podría deberse a la gran cantidad de moléculas circulantes en el organismo, además de los péptidos, o a que los péptidos podrían estarse degradando durante todo el ciclo de infección.

Algunos de los tratamientos para la sepsis se enfocan en la neutralización de uno o más mediadores inflamatorios, como antagonistas del receptor de IL-1 y anticuerpos anti-TNF- $\alpha$ ; sin embargo, no han sido del todo efectivas debido a que las terapias antiinflamatorias podrían incrementar infecciones secundarias y mortalidad (Li et al., 2013). Por ello, la modulación del sistema inmune con AMPs podría ser una terapia con gran potencial para las infecciones bacterianas. El péptido C<sub>ss</sub>54 ha demostrado capacidad para reducir los niveles de citocinas proinflamatorias, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12, en ratones con una infección sistémica a diferentes horas de tratamiento en este trabajo. Algunos AMPs como LL-37 y Ps-K18 han demostrado neutralizar LPS así como reducir niveles de citocinas proinflamatorias; en el caso de Ps-K18, es un péptido de 2,702 Da y carga neta de +3, que tiene la habilidad de bloquear la activación del TLR4/NF- $\kappa$ B y por lo tanto reducir la producción de TNF e IL6 en un modelo *in vivo* (Jang et al., 2019; Nagaoka et al., 2020). Por lo que el C<sub>ss</sub>54, al tener características parecidas, peso de 2,870 Da y carga neta de +5, podría estar actuando de igual manera modulando la respuesta inmune y por lo tanto ser un tratamiento efectivo

contra la sepsis. Se sabe que cuando el lípido A (el centro activo del LPS) interactúa con la proteína de unión a LPS (LBP, por sus siglas en inglés) es extraído del LPS y transferido a la membrana del CD14, iniciando la cascada de señalización del TLR4 y llevando a la producción de los mediadores proinflamatorios. Algunos estudios han demostrado que cuando los AMPs interactúan directamente y con gran afinidad con los LPS, interfieren en la unión con LBP suprimiendo la liberación de citocinas (Lee, Mereuta, Luchian, & Park, 2019; Veloso Júnior et al., 2019); tal es el caso de ToAP3, un AMP aislado del escorpión *T. obscurus* y de tipo NDBP, al igual que Css54, que además se actuar de esa manera también decremента los niveles de transcrito de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Veloso Júnior et al., 2019). Otra posible explicación es que Css54 estaría actuando como un reclutador de leucocitos al sitio de infección afectando la producción de IFN-g y MCP-1 e incrementando la síntesis de IL-10 y suprimiendo los niveles de citocinas proinflamatorias IL-12p70 y TNF-a, como lo han manifestado con otros AMPs que tienen efecto contra *Salmonella* (Silva et al., 2016), lo cual ocurrió con los individuos tratados 2 veces cada 24h (Figura 19). Por último, los resultados sugieren que, si se administra una sola vez el péptido o la quimiocina en un modelo *in vivo*, se tiene un perfil proinflamatorio con ambas moléculas (Figura 18), mientras que si el tratamiento se realiza más de una vez el perfil de Css54 podría ser antiinflamatorio.

## 9. Conclusiones

- El péptido Css54 tiene efecto inhibitorio contra *S. Typhimurium*, y es bactericida.
- La quimiocina MCP-1 no tiene actividad antimicrobiana.
- El péptido Css54 y MCP-1 no causan citotoxicidad a macrófagos RAW 264.7 a concentraciones bajas.
- Css54 y MCP-1 estimulan la fagocitosis de *S. Typhimurium* en células RAW 264.7.
- Css54 neutraliza completamente LPS de *S. Typhimurium*, mientras que MCP-1 no logra inhibir LPS.
- Css54 reduce la carga bacteriana en peritoneo de ratones con sepsis causada por *S. Typhimurium*, pero no en órganos.
- MCP-1 no reduce la carga bacteriana en peritoneo ni órganos de ratones con sepsis.
- Css54 podría tener efecto antiinflamatorio en sepsis.

- MCP-1 presenta efecto proinflamatorio en sepsis inducida con *S. Typhimurium*.
- La combinación de péptido-quimiocina no alivian la sepsis inducida en el modelo *in vivo*.

## **10. Perspectivas**

- Analizar la actividad de Css54 y MCP-1 en macrófagos de línea celular humana.
- Probar si existe un efecto sinérgico de Css54 con antibióticos.
- Evaluar si el tratamiento con MCP-1 induce la expresión de citocinas antiinflamatorias.
- Evaluar el modo de acción de Css54 en membranas bacterianas.

## 11. Referencias

- Andaluz-Ojeda, D., Bobillo, F., Iglesias, V., Almansa, R., Rico, L., Gandía, F., ... Bermejo-Martin, J. F. (2012). A combined score of pro- and anti-inflammatory interleukins improves mortality prediction in severe sepsis. *Cytokine*, 57(3), 332–336. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.12.002>
- Angurana, S. K., Bansal, A., Muralidharan, J., Aggarwal, R., & Singhi, S. (2021). Cytokine Levels in Critically Ill Children With Severe Sepsis and Their Relation With the Severity of Illness and Mortality. *Journal of Intensive Care Medicine*, 36(5), 576–583. <https://doi.org/10.1177/0885066620912989>
- Arenas, I., Villegas, E., Walls, O., Barrios, H., Rodríguez, R., Corzo, G., & Rutledge, P. J. (2016). Antimicrobial activity and stability of short and long based arachnid synthetic peptides in the presence of commercial antibiotics. *Molecules*, 21(2). <https://doi.org/10.3390/molecules21020225>
- Askar, B., Higgins, J., Barrow, P., & Foster, N. (2020). Immunomodulation by vasoactive intestinal peptide is associated with increased survival and growth of Salmonella Typhimurium in mice. *Cytokine*, 125(April 2019), 154787. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154787>
- Ayalon, I., Shen, H., Williamson, L., Stringer, K., Zingarelli, B., & Kaplan, J. M. (2018). Sepsis induces adipose tissue browning in nonobese mice but not in obese mice. *Shock*, 50(5), 557–564. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001076>
- Bhattacharjya, S. (2010). De novo Designed Lipopolysaccharide Binding Peptides: Structure Based Development of Antiendotoxic and Antimicrobial Drugs. *Current Medicinal Chemistry*, 17(27), 3080–3093. <https://doi.org/10.2174/092986710791959756>
- Brandenburg, K., Heinbockel, L., Correa, W., & Lohner, K. (2016). Peptides with dual mode of action: Killing bacteria and preventing endotoxin-induced sepsis. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(5), 971–979. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.01.011>
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 3, pp. 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Broz, P., Ohlson, M. B., Monack, D. M., & Immunity, I. (2012). *typhimurium*, a model enteric

*pathogen* © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . 3(2), 62–70.

- Chensue, S. W. (2001). Molecular machinations: Chemokine signals in host-pathogen interactions. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 821–835. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.821-835.2001>
- Chousterman, B. G., Swirski, F. K., & Weber, G. F. (2017). *Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis*. 517–528. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0639-8>
- Crawford, M. A., Margulieux, K. R., Singh, A., Nakamoto, R. K., & Hughes, M. A. (2019). Mechanistic insights and therapeutic opportunities of antimicrobial chemokines. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 88, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.003>
- Darkwah, S., Nago, N., Appiah, M. G., Myint, P. K., Kawamoto, E., Shimaoka, M., & Park, E. J. (2019). Differential Roles of Dendritic Cells in Expanding CD4 T Cells in Sepsis. *Biomedicines*, 7(3), 52. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7030052>
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 29(6), 313–325. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
- Esche, C., Stellato, C., & Beck, L. A. (2005). Chemokines: Key players in innate and adaptive immunity. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(4), 615–628. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23841.x>
- Fàbrega, A. (2013). *Salmonella enterica Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host : Virulence and Regulation*. 26(2), 308–341. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>
- Farnaud, S., Spiller, C., Moriarty, L. C., Patel, A., Gant, V., Odell, E. W., & Evans, R. W. (2004). Interactions of lactoferricin-derived peptides with LPS and antimicrobial activity. *FEMS Microbiology Letters*, 233(2), 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.01.039>
- French, G. L. (2006). Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections - The potential role of daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(6), 1107–1117. <https://doi.org/10.1093/jac/dk1393>

- Garcia, F., Villegas, E., Espino-Solis, G. P., Rodriguez, A., Paniagua-Solis, J. F., Sandoval-Lopez, G., ... Corzo, G. (2013). Antimicrobial peptides from arachnid venoms and their microbicidal activity in the presence of commercial antibiotics. *Journal of Antibiotics*, *66*(1), 3–10. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.87>
- Gautam, R., Deobagkar-Lele, M., Majumdar, S., Chandrasekar, B., Victor, E., Ahmed, S. M., ... Nandi, D. (2016). Molecular profiling of sepsis in mice using Fourier Transform Infrared Microspectroscopy. *Journal of Biophotonics*, *9*(1–2), 67–82. <https://doi.org/10.1002/jbio.201400089>
- Gomes, R. N., Figueiredo, R. T., Bozza, F. A., Pacheco, P., Amâncio, R. T., Laranjeira, A. P., ... Bozza, M. T. (2006). Increased susceptibility to septic and endotoxic shock in monocyte chemoattractant protein 1/CC chemokine ligand 2-deficient mice correlates with reduced interleukin 10 and enhanced macrophage migration inhibitory factor production. *Shock*, *26*(5), 457–463. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000228801.56223.92>
- Griffith, J. W., Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2014). Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. *Annual Review of Immunology*, *32*(1), 659–702. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120145>
- Gu, L., Tseng, S., Horner, R. M., Tam, C., Loda, M., & Rollins, B. J. (2000). Control of T(H) 2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature*, *404*(6776), 407–411. <https://doi.org/10.1038/35006097>
- Gustafsson, A., Olin, A. I., & Ljunggren, L. (2010). LPS interactions with immobilized and soluble antimicrobial peptides. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, *70*(3), 194–200. <https://doi.org/10.3109/00365511003663622>
- Hancock, R. E. W., & Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, *24*(12), 1551–1557. <https://doi.org/10.1038/nbt1267>
- Herrero-fresno, A., & Olsen, J. E. (2018). *Salmonella Typhimurium* metabolism affects virulence in the host e A. *71*, 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.016>
- Hotchkiss, R. S., & Nicholson, D. W. (2006). Apoptosis and caspases regulate death and

- inflammation in sepsis. *Nature Reviews Immunology*, Vol. 6, pp. 813–822. <https://doi.org/10.1038/nri1943>
- Jang, M., Kim, J., Choi, Y., Bang, J., & Kim, Y. (2019). *Antiseptic Effect of Ps-K18 : Mechanism of Its Antibacterial and Anti-Inflammatory Activities. 1*, 1–17.
- Jones, B. D., Ghori, N., & Falkow, S. (1994). Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the peyer's patches. *Journal of Experimental Medicine*, 180(1), 15–23. <https://doi.org/10.1084/jem.180.1.15>
- Kim, H., Jang, J. H., Kim, S. C., & Cho, J. H. (2016). Enhancement of the antimicrobial activity and selectivity of GNU7 against Gram-negative bacteria by fusion with LPS-targeting peptide. *Peptides*, 82, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.05.010>
- Kim, J., Jacob, B., Jang, M., Kwak, C., Lee, Y., Son, K., ... Kim, Y. (2019). Development of a novel short 12-meric papiliocin-derived peptide that is effective against Gram-negative sepsis. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40577-8>
- Kundumani-Sridharan, V., Singh, N. K., Kumar, S., Gadepalli, R., & Rao, G. N. (2013). Nuclear factor of activated T cells c1 mediates p21-activated kinase 1 activation in the modulation of chemokine-induced human aortic smooth muscle cell F-actin stress fiber formation, migration, and proliferation and injury-induced vascular wall remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, 288(30), 22150–22162. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.454082>
- Lai, Y., & Gallo, R. L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology*, 30(3), 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.12.003>
- Lee, J. K., Mereuta, L., Luchian, T., & Park, Y. (2019). Antimicrobial peptide HPA3NT3-A2 effectively inhibits biofilm formation in mice infected with drug-resistant bacteria. *Biomaterials Science*, 7(12), 5068–5083. <https://doi.org/10.1039/c9bm01051c>
- Liang, T., Leung, L. M., Opene, B., Fondrie, W. E., Lee, Y. I., Chandler, C. E., ... Goodlett, D. R. (2019). Rapid Microbial Identification and Antibiotic Resistance Detection by Mass Spectrometric Analysis of Membrane Lipids. *Analytical Chemistry*, 91(2), 1286–1294. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02611>

- Li, S. A., Xiang, Y., Wang, Y. J., Liu, J., Lee, W. H., & Zhang, Y. (2013). Naturally occurring antimicrobial peptide OH-CATH30 selectively regulates the innate immune response to protect against sepsis. *Journal of Medicinal Chemistry*, *56*(22), 9136–9145. <https://doi.org/10.1021/jm401134n>
- Luo, P., Shao, J., Jiao, Y., Yu, W., & Rong, W. (2018). CC chemokine ligand 2 (CCL2) enhances TTX-sensitive sodium channel activity of primary afferent neurons in the complete Freund adjuvant-induced inflammatory pain model. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *50*(12), 1219–1226. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmy123>
- Martin, L., van Meegern, A., Doemming, S., & Schuerholz, T. (2015). Antimicrobial peptides in human sepsis. *Frontiers in Immunology*, *6*(JUL), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00404>
- Matsukawa, A., Hogaboam, C. M., Lukacs, N. W., Lincoln, P. M., Strieter, R. M., & Kunkel, S. L. (1999). Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *163*(11), 6148–6154. Retrieved from <https://www.jimmunol.org/content/163/11/6148.long>
- Nagaoka, I., Tamura, H., & Reich, J. (2020). Therapeutic potential of cathelicidin peptide ll-37, an antimicrobial agent, in a murine sepsis model. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms21175973>
- Rittirsch, D., Flierl, M. A., & Ward, P. A. (2008). Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nature Reviews Immunology*, *8*(10), 776–787. <https://doi.org/10.1038/nri2402>
- Rosenfeld, Y., Lev, N., & Shai, Y. (2010). Effect of the hydrophobicity to net positive charge ratio on antibacterial and anti-endotoxin activities of structurally similar antimicrobial peptides. *Biochemistry*, *49*(5), 853–861. <https://doi.org/10.1021/bi900724x>
- Rudd, K. E., Johnson, S. C., Agesa, K. M., Shackelford, K. A., Tsoi, D., Kievlan, D. R., ... Naghavi, M. (2020). Global , regional , and national sepsis incidence and mortality , 1990 – 2017 : analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*, *395*(10219), 200–211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7)

- Serbina, N. V., & Pamer, E. G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature Immunology*, 7(3), 311–317. <https://doi.org/10.1038/ni1309>
- Sivashanmugam, A., Murray, V., Cui, C., Zhang, Y., Wang, J., & Li, Q. (2009). Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Science*, 18(5), 936–948. <https://doi.org/10.1002/pro.102>
- Söbirk, S. K., Mörgelin, M., Egesten, A., Bates, P., Shannon, O., & Collin, M. (2013). Human Chemokines as Antimicrobial Peptides with Direct Parasitocidal Effect on *Leishmania mexicana* In Vitro. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058129>
- Taeb, A. M., Hooper, M. H., & Marik, P. E. (2017). Sepsis: Current definition, pathophysiology, diagnosis, and management. *Nutrition in Clinical Practice*, 32(3), 296–308. <https://doi.org/10.1177/0884533617695243>
- Ukkonen, K., Mayer, S., Vasala, A., & Neubauer, P. (2013). Use of slow glucose feeding as supporting carbon source in lactose autoinduction medium improves the robustness of protein expression at different aeration conditions. *Protein Expression and Purification*, 91(2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.07.016>
- Wan, M., van der Does, A. M., Tang, X., Lindbom, L., Agerberth, B., & Haeggström, J. Z. (2014). Antimicrobial peptide LL-37 promotes bacterial phagocytosis by human macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 95(6), 971–981. <https://doi.org/10.1189/jlb.0513304>
- Wang, S., Ye, Q., Wang, K., Zeng, X., Huang, S., Yu, H., ... Qiao, S. (2019). Enhancement of Macrophage Function by the Antimicrobial Peptide Sublancin Protects Mice from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Immunology Research*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3979352>
- Wang, Y., Liu, Q., Liu, T., Zheng, Q., Xu, X., Liu, X., ... Bai, X. (2018). Early plasma monocyte chemoattractant protein 1 predicts the development of sepsis in trauma patients. *Medicine (United States)*, 97(14). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000010356>
- Wood, S., Jayaraman, V., Huelsmann, E. J., Bonish, B., Burgad, D., Sivaramakrishnan, G., ... Shafikhani, S. H. (2014). Pro-inflammatory chemokine CCL2 (MCP-1) promotes healing in

- diabetic wounds by restoring the macrophage response. *PLoS ONE*, 9(3), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091574>
- Xu, D., Liao, C., Xiao, J., Fang, K., Zhang, W., Yuan, W., & Lu, W. (2019). Human enteric defensin 5 promotes *Shigella* infection of macrophages. *Infection and Immunity*. doi:10.1128/iai.00769-19
- Xue, H., Li, S., Zhao, X., Guo, F., Jiang, L., Wang, Y., & Zhu, F. (2019). CYTL1 Promotes the Activation of Neutrophils in a Sepsis Model. *Inflammation*. doi:10.1007/s10753-019-01116-9
- Yang, D., Chen, Q., Hoover, D. M., Staley, P., Tucker, K. D., Lubkowski, J., & Oppenheim, J. J. (2003). Many chemokines including CCL20/MIP-3 $\alpha$  display antimicrobial activity. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(3), 448–455. <https://doi.org/10.1189/jlb.0103024>
- Yao, Y., & Tsirka, S. E. (2014). Monocyte chemoattractant protein-1 and the blood–brain barrier. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(4), 683–697. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1459-1>
- Yasir, M., Dutta, D., & Willcox, M. D. P. (2018). Comparative mode of action of antimicrobial peptide melimine and its derivative Mel4 against *Pseudomonas aeruginosa*. *BioRxiv*, (March), 1–12. <https://doi.org/10.1101/450577>
- Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews*, 57(1), 27–55. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2.27>
- Yung, S. C., & Murphy, P. M. (2012). Antimicrobial chemokines. *Frontiers in Immunology*, 3(SEP), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00276>
- Zasloff, M. (2002). *organisms*. 415(January), 389–395.

## 12. Anexos

### 12.1. Construcción del péptido MCP-1

El péptido MCP-1 es una secuencia que consta de 76 residuos de aminoácidos y no se dispone de su gen codificante. Por tanto, para la construcción de un gen y un péptido recombinante, fue necesario realizar una traducción reversa de la secuencia aminoacídica y posteriormente analizarla para establecer tanto el uso preferencial de codones para *E. coli*, como el balanceo de los mismos codones en la secuencia. A continuación, en el extremo 5' de la secuencia se adicionaron tanto el sitio de digestión para la enzima de restricción *Bam*HI, como el sitio de reconocimiento para la proteasa TEV. En el extremo 3' se adicionaron dos sitios de parada y el sitio de digestión para la enzima de restricción *Pst*I. La finalidad de este último proceso era llegar a clonar el gen en el plásmido pQE30 (QiaGen®) utilizando los sitios de digestión mencionados (En la **Tabla 1** se muestran todo el procedimiento descrito anteriormente).

**Tabla 1.** Flujo de trabajo en términos de secuencias para la obtención del péptido recombinante MCP-1

Descripción	Secuencia
<b>1. Secuencia de residuos de aminoácidos del péptido MCP-1</b>	QPDAINAPVT CCYNFTNRKI SVQRLASYRR ITSSKCPKEA VIFKTIVAKE ICADPKQKWV QDSMDHLDKQ TQTPKT (8685.03 Da; 76 residuos)
<b>2. Traducción reversa del péptido MCP-1 para obtener el DNA codificante</b>	CAGCCGGATGCGATTAACGCGCCGGTGACCTGCTGCTATAACTTTA CCAACCGCAAATTAGCGTGCAGCGCCTGGCGAGCTATCGCCGCA TTACCAGCAGCAAATGCCCGAAAGAAGCGGTGATTTTTAAAACCA TTGTGGCGAAAGAAATTTGCGCGGATCCGAAACAGAAATGGGTGC AGGATAGCATGGATCATCTGGATAAACAGACCCAGACCCCGAAAA CC (228 nucleótidos)
<b>3. Secuencia con análisis de uso preferencial de codones para</b>	CAGCCGGATGCGATTAAtGCaCCtGTGACCTGCTGtTAcAACTTTACg AAtCGtAAAATcAGtGTtCAaCGCCTGGCGAGCTATCGtCGCATTACCA GtAGCAAgtGCCCGAAAGAAGCcGTGATcTTcAAgACgATTGTtGCGA

<b>expresión en <i>E. coli</i> y codones balanceados</b>	AAGAgATcTGtGCaGAcCCGAAgCAGAAATGGGTGCAaGATAGCATG GATCATCTGGATAA gCAGACCCAaACgCCtAAAACt (228 nucleótidos)
<b>4. Secuencia completa: adición de sitios restricción <u>BamHI</u> y <u>PstI</u> y secuencia de proteasa <u>TEV</u></b>	GAGAGGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCCAGCCGGATGCGAT TAA tGCaCCtGTGACCTGCTGtTAcAACTTTACgAA tCGtAAAATcAGtG TtCAaCGCCTGGCGAGCTATCGtCGCATTACCAGtAGCAA gTGCCCGA AAGAAGCcGTGATcTTcAAgACgATTGTtGCGAAAGAgATcTGtGCaGA cCCGAAgCAGAAATGGGTGCAaGATAGCATGGATCATCTGGATAA g CAGACCCAaACgCCtAAAACtTAATAGCTGCAGGAGA (275 nucleótidos)

## 12.2. Características físicas de ratones infectados

- Dos tratamientos: 24 y 48h

Grupo	Día			
	0 (Infección)	1	2	3
1. S. Typhimurium	Normal	Pelo erizado	Diarrea, ojos cerrados. Poco movimiento	Sin movimiento, diarrea, muy delgado.
		Pelo erizado, pérdida de peso, ojos ligeramente cerrados.	Diarrea, ojos cerrados. Sin movimiento	Murió antes de tomar muestra de heces.
		Pelo erizado, evidente pérdida de peso	Diarrea, ojos cerrados. Sin movimiento	Murió antes de tomar muestra de heces.
2. C54	Normal	Normal. Con movimiento, sin pérdida de peso	Normal. Con movimiento, sin pérdida de peso	Normal. Con movimiento, sin pérdida de peso
3. MCP-1	Normal	Normal. Con movimiento, sin pérdida de peso	Normal. Con movimiento, sin pérdida de peso	Normal. Con movimiento, sin pérdida de peso
4. S. Typhimurium + C54	Normal	Pelo erizado, con movimiento normal.	Ojos ligeramente cerrados, pérdida de peso, diarrea.	Sin movimiento, diarrea, muy delgado.
		Pelo erizado, evidente pérdida de peso	Ojos ligeramente cerrados, muy delgado, diarrea.	Sin movimiento, no puede evacuar, muy delgado.
		Pelo erizado, con movimiento.	Ojos ligeramente cerrados, pérdida de peso, diarrea.	Sin movimiento, no puede evacuar, muy delgado.
5. S. Typhimurium + MCP-1	Normal	Pelo erizado, con movimiento.	Ojos ligeramente cerrados, pérdida de peso, diarrea.	Sin movimiento, ojos cerrados, diarrea, muy delgado.
		Pelo erizado, con movimiento.	Ojos ligeramente cerrados, pérdida de peso, diarrea.	Sin movimiento, problemas para evacuar.
		Pelo erizado, evidente pérdida de peso	Ojos ligeramente cerrados, pérdida de peso, diarrea.	Sin movimiento, problemas para evacuar.
6. S. Typhimurium + C54 + MCP-1	Normal	Pelo erizado, con movimiento.	Ojos ligeramente cerrados, pérdida de peso, diarrea.	Poco movimiento, ojos cerrados, diarrea, muy delgado.
		Pelo erizado, con movimiento.	Ojos ligeramente cerrados, pérdida de peso, diarrea.	Poco movimiento, diarrea, muy delgado.
		Pelo erizado, con movimiento.	Ojos ligeramente cerrados, pérdida de peso, diarrea.	Poco movimiento, diarrea, muy delgado.

7. PBS	Normal	Normal. Con movimiento, sin pérdida de peso	Normal. Con movimiento, sin pérdida de peso	Normal. Con movimiento, sin pérdida de peso
--------	--------	---	---	---

- Un tratamiento: 24h

Grupo	Día			
	0 (Infección)	1	2	3
1. S. Typhimurium	Normal	Pelo erizado.	Diarrea, ojos cerrados. Poco movimiento	Sin movimiento, diarrea, muy enfermo.
		Pelo erizado.	Diarrea, ojos cerrados. Poco movimiento	Sin movimiento, problemas para evacuar, muy delgado.
		Pelo erizado.	Diarrea, ojos cerrados. Poco movimiento	Sin movimiento, problemas para evacuar, muy delgado.
2. Css54	Normal	Normal. Con movimiento, sin pérdida de peso	Normal. Con movimiento, sin pérdida de peso	Normal. Con movimiento, sin pérdida de peso
3. MCP-1	Normal	Normal. Con movimiento, sin pérdida de peso	Normal. Con movimiento, sin pérdida de peso	Normal. Con movimiento, sin pérdida de peso
4. S. Typhimurium + Css54	Normal	Pelo erizado, con movimiento normal.	Ojos ligeramente cerrados, pérdida de peso, diarrea.	Poco movimiento, diarrea, muy delgado.
		Pelo erizado, sin pérdida de peso	Ojos ligeramente cerrados, diarrea.	Poco movimiento, diarrea, muy delgado.
		Pelo erizado, con movimiento.	Ojos ligeramente cerrados, pérdida de peso, diarrea.	Sin movimiento, problemas para evacuar, muy delgado.
5. S. Typhimurium + MCP-1	Normal	Pelo erizado, con movimiento, pérdida de peso.	Ojos ligeramente cerrados, mucha pérdida de peso, diarrea.	Poco movimiento, diarrea, muy delgado.
		Pelo erizado, con movimiento.	Ojos ligeramente cerrados, poca pérdida de peso, diarrea.	Poco movimiento, diarrea, muy delgado.
		Pelo erizado, pérdida de peso, con movimiento.	Ojos ligeramente cerrados, mucha pérdida de peso, diarrea.	Poco movimiento, diarrea, muy delgado.
6. S. Typhimurium + Css54 + MCP-1	Normal	Pelo erizado, con movimiento.	Ojos ligeramente cerrados, diarrea.	Poco movimiento, ojos cerrados, diarrea, muy delgado.
		Pelo erizado, con movimiento.	Ojos ligeramente cerrados, poca pérdida de peso, diarrea.	Poco movimiento, diarrea, muy delgado.

		Pelo erizado, con movimiento.	Ojos ligeramente cerrados, poca pérdida de peso, diarrea.	Poco movimiento, diarrea, muy delgado.
7. PBS	Normal	Normal. Con movimiento, sin pérdida de peso	Normal. Con movimiento, sin pérdida de peso	Normal. Con movimiento, sin pérdida de peso