



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PÉPTIDO ANTIMICROBIANO CDAP-4, EN
UN MODELO DE INFECCIÓN CRÓNICA PULMONAR POR *Pseudomonas
aeruginosa*”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
JAZMÍN HERNÁNDEZ VALDEZ**

**TUTOR PRINCIPAL
DR. EDUARDO A. GARCÍA ZEPEDA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR
ZUBIRÁN”**

**DR. FERNANDO ESQUIVEL GUADARRAMA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

CIUDAD DE MÉXICO, . AGOSTO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Biblioteca Central

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM



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.

Le agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) de la Universidad Nacional Autónoma de México por su apoyo para la participación en el “XXIX Congreso Nacional de Bioquímica” de la Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C.

AGRADECIMIENTOS

A todos aquellos que aportaron su granito de paciencia, tolerancia, insistencia, pasión e indiferencia, para que esto pudiese concluir.

A ti, que estuviste presente en parte del camino, que me ayudaste a unir las piezas sin quererlo y que aún sigues doliendo.

A ti, que me ofreciste una oportunidad y me enseñaste que la mejor forma de vivir es confiando y brindar posibilidades a quienes nos encontremos en el camino; y dejar que su trabajo y esfuerzo valide su permanencia en nuestras vidas.

A ti, que a pesar de mis promesas y compromisos incumplidos decidiste enfrentarme desde otra trinchera,

A ti, que me regalaste tu mayor enseñanza, el dejarme terminar en tu ausencia y mirarme en un espejo que no creí ser digna de reflejarme,

A ti, que a pesar de tu partida, aún me ofreces la oportunidad de presentar este trabajo, en el que creímos ambos y le regalamos una parte de nuestras vidas,

A ti, que a pesar de todos los posibles inconvenientes me sigues enseñando,

A ti, mi maestro,

Gracias,

Eduardo A. García Zepeda.

Por que somos ciclos,
con principios y finales, infinitos,
con tendencias y patrones,
que terminan definiendo
nuestra huella en este mundo.

1. ÍNDICE GENERAL

<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
1. Índice General	1
2. Abreviaturas	2
3. Introducción	4
3.1. Respuesta Inmune	5
3.2. Respuesta del Sistema Inmune Frente a una Infección Bacteriana...	5
3.2.1. Respuesta Innata.....	5
3.2.2. Respuesta Adaptativa	6
3.3. Péptidos Antimicrobianos (AMP).....	8
3.3.1. Clasificación de los Péptidos Antimicrobianos	9
3.3.2. Mecanismos de Acción de los Péptidos Antimicrobianos	10
3.3.3 Función Quimiotáctica de los Péptidos Antimicrobianos	13
3.4. Las Quimiocinas.....	13
3.4.1. Quimiocinas Antimicrobianas	16
3.4.2. Péptidos derivados de quimiocinas (CDP) con actividad antimicrobiana.....	19
3.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>P. aeruginosa</i>)	20
3.5.1 Infecciones Pulmonares ocasionadas a <i>P. aeruginosa</i>	24
4. Antecedentes	26
5. Planteamiento del Problema.....	28
6. Justificación.....	29
7. Hipótesis	31
8. Objetivos	32
9. Metodología.....	33
10. Resultados.....	44
11. Discusión.....	66
12. Conclusiones.....	
13. Referencias Bibliográficas	
14. Apéndices	
15. Anexos	
16. Índice de Figuras	
17. Índice de Gráficas.....	

2. ABREVIATURAS

AC	Aislado Clínico
AMP	Péptidos Antimicrobianos
APC	Células presentadoras de antígeno
ATCC	American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)
CAM	Células de adhesión celular
CD	Células dendríticas
CDAP-4	Chemokine-Derived Antimicrobial Peptide-4 (Péptido Antimicrobiano Derivado de Quimiocina 4)
CIPRO	Ciprofloxacino
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease (Enfermedad Crónica Obstructiva Pulmonar)
CV	Cristal Violeta
Da	Dalton
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)
DMSO	Dimetilsulfóxido
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Drogas)
FQ	Fibrosis Quística
H/E	Hematoxilia/Eosina
HNP	Péptidos de neutrófilos humanos
IBA	Infiltrado Bronquioalveolar
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
IPB	Infiltrado Peribronqueal
IPV	Infiltrado Perivascular
IT	Infiltrado Total
kb	Kilobases
kDa	KiloDalton
LB	Caldo Luria-Bertoni
LBA	Lavado Bronquioalveolar
LPS	Lipopolisacáridos
MDa	MegaDalton
μl	Microlitro

μM	Micromolar
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards (Comité Nacional para Estándares de Laboratorios Clínicos)
NK	Células natural killer
NKT	Células T natural killer
NLR	Nod Like Receptors
OMS	Organización Mundial de la Salud
PIA	Agar de aislamiento de <i>Pseudomonas</i>
PBS	Buffer de fosfatos salino
PMN	Polimorfonucleares
RNA	Ácido ribonucleico
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecilsulfato sódico
SS	Solución Salina
TLR	Toll like receptors
TSI	Agar-hierro-triple azúcar
UFC	Unidades formadoras de colonias

3. INTRODUCCIÓN

3.1 RESPUESTA INMUNE

El sistema encargado en responder a estímulos externos detectados como nocivos en los seres humanos es el Sistema Inmune. El cual está compuesto por células y proteínas solubles que en conjunto permiten una respuesta contra estas moléculas, regresando al estado de homeóstasis del organismo para su supervivencia y conservación de su especie (Abbas, 2009 y Kindt, 2007).

Tradicionalmente para su estudio la respuesta inmune se ha dividido en dos: en la respuesta inmune innata e inmunidad adaptativa, en función del tiempo y de los elementos que participan durante cada una de ellas. En la siguiente tabla se resumen las diferentes características de cada tipo de respuesta.

Tabla 1. Características de la Respuesta In Inmunidad Innata y Adaptativa

Característica	Inmunidad Innata	Inmunidad Adaptativa
Elementos celulares	<i>Células hematopoyéticas:</i> Macrófagos, células dendríticas, mastocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células NK y NKTs <i>Células no hematopoyéticas:</i> Células epiteliales	<i>Células hematopoyéticas.</i> Linfocitos T y B, células T reguladoras y células NKTs
Elementos humorales	Proteínas del complemento, proteína C-reactiva, proteínas que reconocen LPS, péptidos antimicrobianos y lectinas de unión a manosa.	Inmunoglobulinas secretadas por los linfocitos B
Receptores característicos	Todas las células de una clase presentan receptores idénticos (no clonal)	Todas las células de una clase expresan un solo tipo de receptores únicos y específicos (clonal)
Reconocimiento de los ligandos	Componentes microbianos conservados, metabolitos o la secuencia biológica de infección.	Epítopes específicos de macromoléculas.

Característica	Inmunidad Innata	Inmunidad Adaptativa
Tipos de receptores	Activación: TLR, NLR y complemento	Receptores de células B y T
Respuesta	Moléculas co-estimuladoras Citocinas (IL-1 β , IL-6) Quimiocinas (IL-8)	Expansión clonal IL-2 Citocinas efectoras (IL-4, INF γ)
Tiempo de respuesta	Inmediata	Horas a días
Memoria inmunológica	Ninguna	Respuesta exacerbada ante una exposición secundaria (inmunidad anticipada)
Riesgo de Autoreactividad	Nula	Alta: el rearreglo genético permite generar receptores autoreactivos.

Modificado de Abbas, 2007.

Cabe mencionar que no todos los elementos reaccionan al mismo tiempo, ni tampoco lo hacen todos, depende del estímulo, el tejido donde se lleve a cabo, la detección, la magnitud de éste y del estado general del organismo.

3.2 RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE FRENTE A UNA INFECCIÓN BACTERIANA

3.2.1 RESPUESTA INNATA. RECONOCIMIENTO, ACTIVACIÓN Y FUNCIONES.

La activación del sistema inmune, en el humano, ocasionada por la presencia de un patógeno bacteriano se debe al reconocimiento de éste por una primera barrera física, principalmente: la piel externa e internamente por los epitelios que recubren los órganos internos. Este reconocimiento entre receptores de las células del hospedero y del patógeno, induce la secreción de citocinas que dan señal de la presencia del patógeno, lo que permite la activación del sistema inmune. En primera instancia son secretados péptidos antimicrobianos (AMP), como las defensinas y la catelicidinas, cuya principal función es la eliminación del patógeno. (Delves y Roitt, 2000). La activación del sistema inmune también incluye al sistema del complemento, una familia de proteínas, que es activado por la presencia de componentes o de anticuerpos contra componentes de la pared bacteriana, opsonizan e inducen la producción de citocinas necesarias para promover la

inflamación, ya sea reclutando células del sistema inmune o su activación facilitando la eliminación de las bacterias (Holers, 2014).

Después del reconocimiento, las primeras células en responder y ser reclutadas a la zona señalada son las células fagocíticas, principalmente macrófagos, que junto con las células epiteliales secretan citocinas y quimiocinas para el reclutamiento de una mayor cantidad de neutrófilos y células dendríticas, las cuales realizan el papel de contención al degranularse y al fagocitar al patógeno (Delves y Roitt, 2000).

Uno de los principales eventos que favorece la fagocitosis es la presentación de antígenos por las células presentadoras de antígenos (APC). Dicho proceso consiste en el reconocimiento del agente patógeno mediante epitopos específicos y su degradación a través de las enzimas proteolíticas y de especies reactivas de oxígeno que son sintetizadas en los lisosomas. Estas vías de síntesis son activadas al fusionarse con el fagosoma que ingreso al antígeno. Posteriormente en el Reticulo Endoplasmático los epitopos antigénicos son asociados a las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), permitiendo la presentación del antígeno de la APC a las células de la inmunidad adaptativa: los linfocitos (Blum et al., 2013).

3.2.2 RESPUESTA ADAPTATIVA

La respuesta adaptativa esta constituida por una respuesta celular y una respuesta humoral. La primera esta integrada por los linfocitos T y B; y la segunda por los anticuerpos producidos por las células plasmáticas.

La respuesta celular es activada cuando se lleva a cabo la presentación del antígeno a partir de una APC a los linfocitos T, el microambiente de citocinas favorece que los linfocitos T se diferencien en células citotóxicas (Tc) y células efectoras (Th), siendo diferentes en funciones y en su papel dentro del proceso inflamatorio. Las primeras reconocen células infectadas o transformadas y promueven su eliminación y las segundas favorecen el microambiente de citocinas Th1 o Th2 y la cooperación con el linfocito B a través de la activación de moléculas en el linfocito B.

Los linfocitos Th a su vez pueden diferenciarse y especializarse aun más, de manera clásica en Th1, Th2 y Treg, sin embargo, existen evidencias de plasticidad y hay referencias que indican que existen más grupos además de los mencionados y por otro lado que tal diversidad no existe, hoy en día es tema de controversia (Luckheeram et al., 2012).

Por otra parte, una vez que los linfocitos B han reconocido al antígeno, las citocinas del ambiente promueven su proliferación, su genoma comienza a

reordenarse para generar los anticuerpos específicos contra el antígeno y finalmente una parte de los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas para producir los anticuerpos, los cuales se encargaran de opsonizar para neutralizar y facilitar la fagocitosis del antígeno; y los linfocitos B no diferenciados pasan a formar parte de la respuesta de memoria, que serán activados en una infección secundaria por el mismo patógeno (Tobón et al., 2013).

En la Figura 1 se ilustra la respuesta del sistema inmune, tanto de la inmunidad innata (complemento) y la inmunidad adaptativa (anticuerpos), en presencia de bacterias Gram negativas.

Figura 1. Mecanismo de acción del sistema inmune. En una infección secundaria: 1) Los anticuerpos neutralizan las toxinas bacterianas. 2) La activación del complemento (C3-C5) mediado por la superficie de la bacteria permite su lisis. 3) Los anticuerpos y la proteína C3b se unen a la bacteria, las cuales opsonizan para incrementar la fagocitosis. 4) C3a, C4a y C5a inducen la degranulación de los mastocitos, secretando sustancias que median la vasodilatación y extravasación de linfocitos y neutrófilos. 5) Otras proteínas activadas del complemento son quimiotácticas para neutrófilos y macrófagos.

Modificado de Kuby, 2007

3.3 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (AMP)

Anteriormente se mencionó que uno de los factores solubles que se secretan para la contención y eliminación de los patógenos son los péptidos antimicrobianos (AMP). Dichos péptidos se encuentran en todos los vertebrados así como en algunos invertebrados, como parte de uno de los primeros mecanismos evolutivos de protección de los organismos (Rossi et.al, 2008).

Los péptidos antimicrobianos son moléculas de bajo peso molecular, con propiedades fisicoquímicas que les permiten tener un efecto sobre bacterias ya sea matándolas o inhibiéndolas, debido a su naturaleza catiónica y anfipática (Jenssen et.al, 2006).

En el ser humano se conocen tres tipos de péptidos antimicrobianos: Las defensinas, las histatinas y la catelicidina LL-37. Las defensinas son catiónicas ricas en cisteína y arginina, con seis residuos de cisteína que forman tres puentes de disulfuro altamente conservados.

De acuerdo a su estructura y función, las defensinas se dividen en: α -defensinas, β -defensinas y θ -defensinas. Se han identificado seis α -defensinas, 4 en los neutrófilos (HNP-1–HNP-4) contenidas en los gránulos azurófilos; y dos en las células del intestino delgado (HD-5 y HD-6). La β -defensina-1 se expresa en células epiteliales del tracto urinario y respiratorio, mientras que la expresión de β -defensina-2 (HD-2) es inducida por infecciones o estímulos inflamatorios en células epiteliales de todo el cuerpo. La única catelicidina en el humano es la HCAP-18/LL-37, que es expresada en células mieloides, queratinocitos, células epiteliales y varios linfocitos. La histatina se encuentra en la saliva y tiene actividad inhibitoria sobre los hongos (Smet, 2005 y Ganz, 2004).

Las defensinas y catelicidinas pueden unirse a los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias y permitir el daño de la pared y membrana bacteriana. Las HNPs incrementan la actividad fagocítica de los neutrófilos, por la estimulación de la degranulación de los mastocitos, HNP-1 y 2 son quimioatrayentes de linfocitos T y las defensinas α y β son quimioatrayentes para las células dendríticas.

Las características fisicoquímicas que les confieren la actividad antimicrobiana se ha asociado principalmente a su cationicidad, punto isoeléctrico (PI) elevado, su bajo peso molecular y sus propiedades anfipáticas.

3.3.1 CLASIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Los péptidos antimicrobianos están divididos en 4 subgrupos con base en su composición de aminoácidos y estructura.

El 1º grupo contiene péptidos antimicrobianos aniónicos, son muy pequeños entre 721- 823 Da. Se encuentran en proteínas surfactantes, lavados bronquialveolares y células epiteliales, requieren zinc como cofactor y poseen actividad contra bacterias Gram positivas y negativas.

El 2º grupo esta constituido por péptidos catiónicos, con un tamaño aproximado de 40 aminoácidos (4,000 Da), carecen de residuos de cisteína, algunos no poseen estructuras en solución acuosa, pero en presencia de trifenil-etanol, SDS, micelas, vesículas fosfolipídicas, liposomas o lípidos, adoptan una estructura α -hélice.

El 3er grupo formado por péptidos catiónicos que carecen de residuos de cisteína y son lineales, aunque algunos forman estructuras de giros extendidos, y contienen altos contenidos de ciertos aminoácidos por ejemplo: PR-39 ricos en residuos de prolina y arginina, las indolicinas ricas en triptófano y la profenina que es rica en prolina y fenilalanina (Brogden et.al, 2003).

El 4º grupo está formado por péptidos catiónicos y aniónicos, contienen residuos de cisteína, forman enlaces disulfuro y estructuras β -plegadas estables.

En la figura 2 se muestran ejemplos de AMP de los diferentes subgrupos.

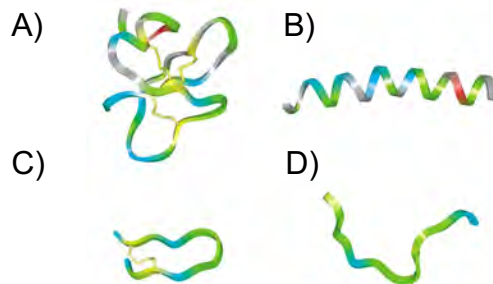


Figura 2. Modelos moleculares de diferentes clases de péptidos catiónicos. A) HBD-2 el cual forma una estructura de triple hélice y un pequeño segmento helicoidal en la parte N-terminal, ejemplo de el 4º grupo B) péptido anfipático (estructura helicoidal del Magainin 2) ejemplo del 3º grupo. C) La estructura de bucle de la bactericina bovina, ejemplo del 1º grupo D) La estructura extendida en forma de barco de la indolicina bovina, ejemplo del 2º grupo. Las estructuras se muestran con las regiones cargadas en azul y los residuos hidrofóbicos en verde.

Modificado de Hancock, 2001.

3.3.2 MECANISMOS DE ACCIÓN

De acuerdo con el efecto que ejercen sobre la membrana del patógeno los AMPs se clasifican en permeabilizadores (hacen poros) y no permeabilizadores (inhibidores de procesos metabólicos e inhibidores de síntesis de DNA) (Brogden et.al, 2003).

El mecanismo por el cual los péptidos afectan la membrana se realiza en tres pasos:

1. Interacción membrana-péptido, es la atracción entre el péptido y la célula blanco por medio de interacciones electrostáticas.

2. El anclaje, se lleva a cabo en relación a la concentración del péptido, en relaciones bajas péptido/lípido, los péptidos se unen paralelamente a la bicapa lipídica; si se incrementa esta relación los péptidos se orientan perpendicularmente a la membrana.

3. Formación de poros transmembranales. Para explicar el mecanismo de permeabilidad se han propuesto diversos modelos entre los que se incluyen:

a) Modelo de hoyo de polilla o de tapete. Los péptidos son atraídos por las cargas electrostáticas a los grupo fosfato, recubren la membrana se orientan paralelamente y actúan como detergentes, rompiendo la membrana al formar micelas (Hancock y Diamond, 2000).

b) Modelo de tapón de barril. Los péptidos se inserta en una orientación perpendicular al plano de la bicapa formando las duelas en una barril en forma de racimo, las regiones hidrofóbicas del péptido se alinean con la región lipídica central de la membrana y la región hidrofílica del péptido forma la región interna del poro (Guilhelmelli et al., 2013).

c) Modelo de poro toroidal. Los AMP con alfa hélice se unen a la membrana, agregándose e induciendo que la monocapa de lípidos se pliegue sobre si misma de forma continua, estabilizando la formación de poros por las interacciones entre las regiones apolares con las cabezas de los lípidos membranales, así como la interacción con las cadenas acilares. En este proceso la membrana se curva hacia adentro de tal manera que la capa lipídica y los poros también lo hacen (Mihajlovic, 2010).

d) Modelo de agregación. Los péptidos se unen a la membrana de una manera desordenada formando complejos micelares de péptidos con lípido (Jenssen et al., 2006).

e) Electroporación molecular. Algunos péptidos son capaces de formar un potencial eléctrico a través de la bicapa que es suficiente para la formación del poro (Jenssen et al., 2006).

f) Balsas lipídicas que se hunden. Los péptidos anfipáticos pueden causar una pérdida del balance por unión y deformación (hundimiento) de las balsas lipídica en la bicapa lipídica, formando poros transitorios (Jenssen et al., 2006).

Los mecanismos de acción de los péptidos que no actúan a nivel de permeabilización de la membrana son:

a) Inhibiendo la síntesis de DNA y RNA, al impedir el funcionamiento de las enzimas de replicación de los ácidos nucleicos, como la buforina II, pleurocidina y dermaseptina (Jensen et al., 2006).

b) La síntesis de proteínas es otro blanco para los péptidos antimicrobianos, disminuyendo la velocidad de la síntesis de proteínas de la pared celular, como la indolicidina y PR-39 (Jensen et al., 2006).

c) Inhibiendo la actividad enzimática. Por ejemplo impidiendo el correcto plegamiento de proteínas, como la pirrocidina que inhibe la actividad de la ATPasa de DnaK, una enzima que funciona como chaperona en el plegamiento de proteínas; o inhibiendo las enzimas que participan en la modificación de los aminoglucósidos (Jensen et al., 2006).

e) Impiden la formación de componentes estructurales de la pared celular, por ejemplo los lantibióticos como la nisina y mersacidina pueden unirse e inhibir la transglicosilación de lípidos II el cual es necesario para la síntesis de peptidoglicanos (Jensen et al., 2006).

En la figura 3 se muestran diversos mecanismos de acción de los AMP sobre la membrana de las bacterias.

Figura 3. Mecanismos de acción de los AMPs permeabilizadores y no permeabilizadores. La membrana lipídica bacteriana esta representada en color amarillo y los péptidos como los cilindros, donde las regiones hidrofílicas son de color rojo y las hidrofóbicas de color azul. Los modelos de permeabilización de la membrana son: el modelo de “agregación” (A), el modelo del “poro toroidal” (B), el modelo del “tapón de barril” (C), el modelo de “tapete” (D). Los mecanismos de acción de los péptidos que no actúan a nivel de permeabilización de la membrana son: inhibiendo la síntesis de DNA y RNA (E), la síntesis de proteínas es otro blanco para los péptidos antimicrobianos (F), al igual que el ensamblaje de proteínas (G), inhibiendo la síntesis de aminoglucósidos (H) y la síntesis de peptidoglicanos (I).

Modificado de Jenssen, 2006.

3.3.3 FUNCIÓN QUIMIOTÁCTICA DE LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Durante mucho tiempo se creyó que los péptidos antimicrobianos exclusivamente tenían la función de inhibir o eliminar a patógenos, sin embargo actualmente sabemos que participan como mediadores de la inflamación, al favorecer la secreción de citocinas, la proliferación celular, la angiogénesis, el balance proteasa-antiproteasa y la quimiotaxis (Beisswenger y Bals, 2005).

El descubrimiento de su actividad quimiotáctica se debió a Chervov y Col. en 1996. Sus estudios basados en las defensinas (H1 y H2) junto a CAP-37 localizados en los granulos de los neutrófilos, permitieron describir que aunada a su actividad antimicrobiana, también tienen la capacidad de inducir quimiotaxis de los monocitos y linfocitos T; actividad que prácticamente había sido descrita para las quimiocinas (Chertov et al., 1996).

Este estudio permitió conocer una nueva función de los AMP's y también formular que las moléculas podían compartir funciones, las defensinas de quimioatracción y las quimiocinas con la capacidad de contener, inhibir o eliminar a los microorganismos. Ésta hipótesis fue comprobada en 1999 por Yang y col, al demostrar que la β -defensina-2 tiene función quimiotáctica con células que expresan el receptor CCR6, al cuál solo se le conocía como ligando a la quimiocina CCL20/MIP-3 α , al realizar ensayos de actividad antimicrobiana con ambas moléculas: la β -defensina y CCL20, se describió que la quimiocina tuvo mayor actividad antimicrobiana que la defensina en cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Yang et al., 1999).

3.4 QUIMIOCINAS

El sistema inmune está compuesto por billones de células móviles que recorren todo el cuerpo. Las señales que les permitan su comunicación para acudir a donde son necesarias en tiempo y espacio están dadas por las quimiocinas. Entre otras funciones que se han descrito son: activación y diferenciación de células, angiogénesis, metástasis, inflamación, desarrollo de órganos linfáticos, desarrollo de las respuestas Th1 y Th2 así como la cicatrización de heridas (Rossi, 2008).

Las quimiocinas son una superfamilia de pequeños péptidos, entre 90 – 130 aminoácidos, conformada por más de 50 elementos y pueden ser divididas en 4 subgrupos, basadas en el número y el espaciamiento entre el primero y el segundo residuo de cisteína en la parte amino terminal: CXC (familia- α), CC (familia- β), C (familia- γ) y CX3C (familia- δ) donde X es un aminoácido (Griffith et al., 2014).

La subfamilia CXC, tiene un aminoácido separando a los primeros dos residuos de cisteína. Este grupo puede dividirse con base en la presencia o ausencia de los aminoácidos Glu-Leu-Arg (ELR) localizado después del primer residuo de cisteína. Las quimiocinas ELR se unen al receptor CXCR2 y generalmente actúan en la quimiotaxis y activación de los neutrófilos. Las quimiocinas ELR- se unen a los receptores CXCR3-5 y principalmente actúan sobre los linfocitos. Se han identificando 14 diferentes genes como los responsables de codificarlas (Janeway y Medzhitov, 2002).

En la subfamilia CC, las primeras dos cisteínas son adyacentes una a la otra, cuenta con 24 miembros y sus células blanco son los leucocitos. La subfamilia C esta conformada por la linfotactina y SCM- 1b, las cuales han perdido la primera y la tercera cisteína. La Fractalcina es el único elemento que conforma a la subfamilia de la clase CXC, tiene tres aminoácidos entre los dos primeros residuos de cisteína, es una proteína transmembranal con el dominio N-terminal fusionado a su larga cola de mucina.

Las quimiocinas ejercen su función biológica al unirse al receptor con 7 fases transmembranales acoplado a proteína G activando vías de señalización (GPCR). Se conocen diez receptores para el subgrupo CC (CCR1-10), siete para CXC (CXCR1-6 y CXCR3B), uno para CX3C (CX₃CR1) y uno para C (XCR1). Y dos receptores señuelo Duffy y D6 los cuales no señalizan, pero se ha demostrado que se unen a quimiocinas inflamatorias las cuales internalizan y las degradan, como parte del mecanismo de regulación de su actividad (Janeway y Medzhitov, 2002).

Funcionalmente las quimiocinas pueden dividirse en inductoras de inflamación y las que se expresan constitutivamente u homeostáticas. Las quimiocinas inflamatorias son críticas en la atracción de diversos tipos de leucocitos a sitios inflamados, además que también reclutan neutrófilos, monocitos/macrófagos, células dendríticas y células NK, ya que pueden unirse a más de un receptor de quimiocina. Las quimiocinas homeostáticas son importantes en la migración de las células presentadoras de antígeno y linfocitos en los nódulos linfáticos, otras son importantes en el tráfico controlado de las células T efectoras.

A continuación en la tabla 2 se muestran algunas quimiocinas, con la antigua y nueva nomenclatura, así como sus receptores, células blanco y el cromosoma donde se encuentran los genes que las codifican.

Tabla 2. Características de las Quimiocinas.

Quimiocina	Nombre sistemático	Cromosoma	Célula blanco	Receptor específico
------------	--------------------	-----------	---------------	---------------------

ELR+CXC	CXCL			
IL-8	8	4	Neutrófilos, basófilos, células T.	CXCR1
GRO α	1	4	Neutrófilos	CXCR2-1
GRO β	2	4	Neutrófilos	CXCR2
GRO γ	3	4	Neutrófilos	CXCR2
ENA-78	5	4	Neutrófilos	CXCR2
LDGF-PBP	7	4	Fibroblastos, neutrófilos	CXCR2
GCP-2	6	4	Neutrófilos	CXCR2
ELR-CXC				
PF4	4	4	Fibroblastos	Desconocido
MIG	9	4	Activación de linfocitos T	CXCR3
IP-10	10	4	Activación de linfocitos T (TH1 > TH2)	CXCR3
SDF-1 α/β	12	10	Células de medula ósea CD34+. Linfocitos T,	CXCR4
BUNZO/STR	16	17	Células dendríticas, células B, linfocitos T activados CD4	CXCR6
C33	11	4	Linfocitos T, NKT	CXCR3
I-TAC	13	4	Activación de linfocitos	CXCR5
BLC/BCA-1			Linfocitos T activados CD4 y células B indiferenciadas	
CC	CCL			
MIP-1 α	3	17	Monocitos/macrófagos, activación de linfocitos T (TH1 > TH2), células NK, basófilos, CD, células de medula ósea	CCR1, 5
MIP-1 β	4	17	Monocitos/macrófagos, Activación de linfocitos T (TH1 > TH2), células NK, basófilos, CD, células de medula ósea	CCR1, 5
MDC	22	16	CD inmaduras, IA células NK, linfocitos T (TH2 > TH1), timocitos	CCR4
TECK	25	19	Macrófagos, timocitos, CD	CCR9
TARC	17	16	Linfocitos T (TH2 > TH1) inmaduras, CD inmaduras, células IA NK, linfocitos T (TH2 > TH1) timocitos	CCR4
RANTES	5	17	Monocitos/macrófagos, linfocitos T (memoria, >TH1 > TH2), células NK, basófilos, eosinófilos y CD	CCR1, 3, 5
HCC-1	14	17	Monocitos	CCR1
HCC-4	16	17	Monocitos	CCR1
DC-CK1	18	17	Linfocitos T indiferenciados > linfocitos T	Desconocido
MIP-3 α	20	2	Linfocitos T (memoria > linfocitos T), células mono nucleares de sangre periférica, células de medula ósea y CD.	CCR6
MIP-3 β	19	9	Linfocitos T indiferenciados, CD maduras, linfocitos B	CCR7
MCP-1	2	17	Linfocitos T, monocitos, basófilos	CCR2
MCP-2	8	17	Linfocitos T, monocitos, eosinófilos basófilos	CCR2
MCP-3	7	17	Linfocitos T, monocitos, eosinófilos, basófilos y	CCR2
MCP-4	13	17	CD	
	12	(11)	Linfocitos T, monocitos, eosinófilos, basófilos y CD	CCR2, 3
Quimiocina	Nombre sistemático	Cromosoma	Célula blanco	Receptor específico
Eotaxina	11	17	Eosinófilos, monocitos, linfocitos T	CCR2
	24	?	Eosinófilos	CCR3

Eotaxina-2/MPIF-2	1	17	Linfocitos T(?), eosinófilos, basófilos	CCR3
I-309	15	17	Neutrófilos (solo TCA-3), linfocitos T	CCR8
MIP-5/HCC-2	23	17 (?)	Linfocitos T, monocitos, neutrófilos (?), y CD	CCR1, 3
MPIF-1	21	9	Monocitos, linfocitos T, neutrófilos (?)	Desconocido
6Ckine			Linfocitos T indiferenciados, linfocitos B, células mesangiales (?)	CCR7
	27	9	Linfocitos T	CCR10
CTACK	28	5	Linfocitos T, eosinófilos	CCR10, 3
MEC				
C y CX3C				
Linfotactina	XCL 1	1	Linfocitos T, células NK	XCR1
Fractalcina	CX3CL 1	16	Linfocitos T, monocitos, neutrófilos (?)	CX3CR1

Modificado de Janeway 2005.

3.4.1 QUIMIOCINAS ANTIMICROBIANAS

Para que la respuesta inmune innata sea efectiva en tiempos muy cortos cuenta con moléculas que tienen un efecto antimicrobiano. Las más caracterizadas son las defensinas y catelicidinas, como se mencionó anteriormente. Su actividad antimicrobiana es mediada por la inserción del péptido en la pared celular del patógeno, formando poros que permeabilizan la membrana y finalmente conllevan a la lisis de éstos (Smet, 2005). Las defensinas y las quimiocinas tienen funciones que se comparten como es el caso de la actividad quimiotáctica sobre los linfocitos, las células dendríticas y neutrófilos; la actividad antimicrobiana, algunos aminoácidos (residuos de cisteína en la parte N-terminal) y su estructura terciaria (alfa hélices) es muy semejante (Ganz, 2003).

Recientemente se comenzó a describir que las quimiocinas presentaban actividad antimicrobiana *in vitro* frente a diferentes cepas bacterianas, el primer reporte se realizó en el 2000 con las quimiocinas CXCL4/hPF-4 y CXCL7/NAP-2, presentes en los gránulos α de las plaquetas, donde, a través de la región C-terminal de las quimiocinas inhibió el crecimiento de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus lactis* y *Cryptococcus neoformans* (Krijgsveld et al., 2000); seguido por un análisis de 11 quimiocinas representantes de cada familia, encontrando que CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 y CXCL11/ITAC tienen actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *Lysteria monocytogenes* (Cole et al., 2001); posteriormente se reportó a CCL28/MEC con actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonie* y *Candida albicans*, en el cual se asocia que la

región C-terminal (con alto contenido en los aminoácidos RKDRK) es esencial pero no suficiente para la actividad antimicrobiana (Hieshima et al., 2003). Yang y colaboradores analizaron 30 quimiocinas de las cuales 21 presentaron actividad como se muestra en la tabla 3 contra *S. aureus* y *E coli* (Yang et al., 2003). El último reporte sobre nuevas quimiocinas con actividad antimicrobiana se presentó en 2010, sumando a CCL6/C10, CCL14/HCC-1 y CCL15/HCC-2 a la lista de quimiocinas con actividad antimicrobiana (Kotarsky et al., 2010).

Sin embargo, el análisis de la actividad antimicrobiana *in vitro* de las quimiocinas se ha realizado con diferentes métodos, cepas y condiciones, por lo que los resultados obtenidos no han sido del todo concordantes, por ejemplo en el 2005 se reportó que CXCL8/IL-8 y CXCL6/GCP-2 presentaban actividad antimicrobiana (Bjoürstad et al, 2005), sin embargo anteriormente fueron reportadas como carentes de tal actividad por Yang y col. en el 2003; este hecho ha propiciado que se analicen y asocien características fisicoquímicas, conformaciones estructurales y secuencias, que permitan entender su actividad en diferentes condiciones y frente a diferentes microorganismos.

Hasta el momento solo se han reportado dos estudio *in vivo* donde las quimiocinas presentan actividad antimicrobiana; ambos en modelo murino de infección pulmonar con *Bacillus anthracis*. El primero demuestra la actividad antimicrobiana de CXCL10/IP-10, al impedir la esporulación de la bacteria y por ende la progresión y eliminación de la infección rápidamente (Crawford et al., 2010) y en el segundo se correlaciona las concentraciones de CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 y CXCL11/ITAC durante la infección, ya que ratones tratados con anticuerpos neutralizantes de las quimiocinas se vuelven mas susceptibles a la infección (Crawford et al., 2011). Mostrando la participación de las quimiocinas durante la infección y sugiriendo un papel antimicrobiano directo sobre el agente patógeno.

Además de la actividad antibacteriana y antifúngica, las quimiocinas también cuentan con actividad antimicrobiana del tipo: antivirica con CCL5/RANTES, CCL8/MCP-2 y CXCL12/SDF-1 inhibiendo la entrada del virus del VIH en células hospederas (Yang et al., 2012); y antiparasitaria con CXCL6/GCP-2, CXCL9/MIG y CCL28/MEC contra los promastigotes de *Leshmania mexicana* (Sobirk et al., 2013) y CXCL4/hPF4 contra *Plasmodium falciparum* atacando las vacuolas digestivas del parásito (Love et al., 2012).

A continuación en la tabla 3, se muestran los resultados obtenidos en el estudio de Yang en el 2003, en la cuál se reporta la actividad de las quimiocinas frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, además de incluir el punto isoeléctrico (PI) de cada una, para establecer una asociación con su actividad.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de las quimiocinas

Quimiocina		PI calculado	Actividad antimicrobiana (% de muerte $\pm$ SD)	
Familia	Miembro		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
CXC	CXCL1/Gro	9.80	87 $\pm$ 13	22 $\pm$ 11
	CXCL2/Gro	10.27	78 $\pm$ 9	26 $\pm$ 9
	CXCL3/Gro	9.85	64 $\pm$ 11	39 $\pm$ 10
	CXCL6/GCP-2	9.06	0	0
	CXCL8/IL-8	8.97	0	0
	CXCL9/MIG	10.83	100	81 $\pm$ 11
	CXCL10/IP-10	10.52	100	77 $\pm$ 12
	CXCL11/I-TAC	10.48	72 $\pm$ 10	69 $\pm$ 9
CX3C	CXCL12/SDF-1 $\dagger$	10.51	86 $\pm$ 12	59 $\pm$ 7
C	CXCL13/BCA-1	10.91	83 $\pm$ 9	50 $\pm$ 10
CC	CXCL14/BRAK	10.28	50 $\pm$ 10	35 $\pm$ 8
	CX3CL1/fractalcina	9.78	0	0
	XCL1/linfotactina	11.35	100	47 $\pm$ 9
	CCL1/I-309	10.10	88 $\pm$ 12	37 $\pm$ 5
	CCL2/MCP-1	9.58	0	0
	CCL3/MIP-1	4.60	0	0
	CCL5/RANTES	9.25	0	0
	CCL7/MCP-3	10.10	0	0
	CCL8/MCP-2	10.38	26 $\pm$ 12	0
	CCL11/eotaxina	10.35	66 $\pm$ 7	49 $\pm$ 10
	CCL13/MCP-4	10.40	76 $\pm$ 9	0
	CCL16/LEC	8.71	0	0
	CCL17/TARC	9.29	59 $\pm$ 10	46 $\pm$ 8
	CCL18/PARC	9.39	100	69 $\pm$ 9
	CCL19/MIP-3	10.16	82 $\pm$ 10	0
	CCL20/MIP-3	10.08	100	51 $\pm$ 7
	CCL21/SLC	10.46	45 $\pm$ 9	75 $\pm$ 8
	CCL22/MDC	9.04	100	74 $\pm$ 11
	CCL25/TECK	10.6	68 $\pm$ 13	48 $\pm$ 12
	CCL27/CTAK	9.11	0	0

Modificado de Yang et al., 2003

3.4.2 PÉPTIDOS DERIVADOS DE QUIMIOCINAS (CDP) CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La diversidad en intensidad de respuesta y tipo de microorganismos que se ven inhibidos por las quimicinas han sido tratadas de ser explicadas al asociar sus características fisicoquímicas a su respuesta, como lo es su cationicidad, su

anfipaticidad y su estructura tridimensional de alfa helices, características que comparten con las defensinas.

Por otro lado, la existencia de quimiocinas que con su estructura completa no tienen actividad antimicrobiana y al escindirse, principalmente la porción perteneciente a la región C-terminal conserva las características de un péptido antimicrobiano, adquiere dicha actividad, como lo son CXCL8/IL-8 (Björnstad et al, 2005) y CXCL-7/ NAP-2 (Krijgsveld; et.al, 2000). Inclusive existen quimiocinas que al escindirse aumenta su potencia como lo es CCL-20/MIP α (Yang et al., 2003), sin embargo también existe el caso contrario que cuando se escinde la quimiocina pierde potencia antimicrobiana como lo es para el caso de CXCL6/GCP-2 (Yang et al., 2003), con lo anterior se reconoció que existen porciones de las quimiocinas implicadas en la actividad antimicrobiana.

Con la búsqueda del mecanismo de acción antimicrobiana de las quimiocinas y con la información ya reportada, se han sintetizado péptidos derivados de éstas, que permitan realizar un análisis sobre la actividad antimicrobiana de las quimiocinas originando a los Péptidos Derivados de Quimiocinas (Chemokine Derived Peptides, CDP).

Es así que aunados a los CDP's de CCL20/MIP-3 α : MIP-3 α_{51-70} y MIP-3 α_{59-70} , con actividad antimicrobiana contra *E. coli* (Yang et al., 2003); de CXCL8/IL-8: IL-8 $_{81-99}$ con actividad antimicrobiana contra Gram positivas y Gram negativas (Björnstad et al, 2005); y a los de CXCL-7/NAP-2: TC-1 y TC-2, donde solo TC-1 presenta actividad antimicrobiana contra cepas Gram positivas y Gram negativas (Krijgsveld; et.al, 2000)., se sumó: CDAP-4 proveniente de la región C-terminal de la quimiocina CCL-13 (Martínez-Becerra et al., 2007) que presentó actividad antimicrobiana principalmente contra cepas Gram negativas y aislados clínicos; RP-1 y AA-RP-1 basadas en el dominio α -helice de la quimiocina CXCL4/PF4 la cuál tiene actividad antiparasitaria (Erfe et al., 2012), además de los péptidos PMX207 y PMX1207 de la quimiocina humana (CXCL4/hPF4) con actividad antiparasitaria y contra cepas Gram negativas y Gram positivas (Bourbigot et al., 2009).

En la tabla 4 se muestran los diferentes péptidos derivados de quimiocinas que han sido reportadas con actividad biológica, la quimiocina de la cual se originan, la región molecular a la que pertenecen y los microorganismos sobre los cuales se han visto actividad antimicrobiana.

Tabla 4. Péptidos derivados de quimiocinas con actividad antimicrobiana

CDP	Quimiocina	Región	Blanco biológico
vMIP-II r1-21	vMIP-II	N-terminal	Inhibición de VIH-1 entérico
MIP-3 α_{51-70}	CCL20/MIP-3a	C-terminal	<i>E. coli</i> (ML35)

MIP-3 α_{59-70}	CCL20/MIP-3a	C-terminal	<i>E. coli</i> (ML35)
TC-1	CXCL7/NAP-2	C-terminal	<i>E. coli</i> (ML35) <i>B. subtilis</i> (ATCC6633) <i>S. aureus</i> (42D) <i>C. neoformans</i> (CI) <i>C. glabrata</i> (CI)
IL-8 $_{81-99}$	CXCL8/IL-8	C-terminal	<i>E. coli</i> (MG1655) <i>S. enterica</i> (MS10) <i>K. pneumoniae</i> (CCUG 49243) <i>H. pylori</i> (SS1) <i>S. pyogenes</i> (CCUG49246)
CCL13 $_{57-75}$	CCL13/MCP-4	C-terminal	<i>E. coli</i> (ATCC25922) <i>S. typhimurium</i> (ATCC14028) <i>S. typhi</i> (ATCC 9993) <i>K. pneumoniae</i> (PIMM-UNAM28) <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 15692) <i>P. aeruginosa</i> (AC)
RP-1	CXCL4/PF4	C-terminal	<i>L. mayor</i> <i>L. infantum chagasi</i> (MHOM/BR/00/1669) <i>L. braziliensis</i> (AC)
PMX207, PMX1207	CXCL4/PF4	C-terminal	<i>P. falciparum</i> (3D7) <i>E. coli</i> (ATCC 25922) <i>S. aureus</i> (ATCC 27660) <i>E. fecalis</i> (ATCC 29212) <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145) <i>K. pneumoniae</i> (ATCC13883)

AC. Aislado clínico

Modificado de Valdivia, 2015

3.5 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) es un bacilo Gram negativo, que es considerado como oportunista debido a la capacidad que tiene de generar infecciones en pacientes con un sistema inmune deteriorado y es incapaz de montar una respuesta inmune efectiva; los pacientes susceptibles a infecciones por esta bacteria son: Los pacientes quemados, intubados, con una enfermedad inmunosupresora y con fibrosis quística (FQ) (Arancibia et al., 2002).

Esta bacteria cuenta con diversos factores de virulencia que facilitan su invasividad y el proceso infeccioso en el cuerpo humano. A continuación se hará mención de los mas importantes.

a) El *flagelo* y *pilis tipo 4* que han sido descritos como participantes y determinantes en la formación de biopelículas (Kipnis et al., 2006), además de

favorecer la formación de microcolonias que permiten evadir la respuesta inmune y el efecto de los antibióticos (Craig et. al., 2004).

b) El *Sistema de Secreción Tipo 3 (T3SS)* que es propio de las bacterias Gram negativas, permite la inyección de toxinas dentro de las células favoreciendo su ingreso e invasividad al tejido infectado .

c) El *sistema de detección Quorum (QS)* es un mecanismo de comunicación entre las células bacterianas a través de compuestos secretados por ellas mismas (autoinductores) para responder a las condiciones ambientales, permitiendo que las bacterias se adapten a diversos y desfavorables condiciones; *P. aeruginosa* genera 3 autoinductores: 3-oxo-dodecenoil-homoserina-lactona (C12-HSL), Butiril homoserina Lactona (C4 HSL) y 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) que son coreguladores de las proteínas LasR, RhIR, y PqsR los cuales controlan la supervivencia, la formación de biopelículas y la producción de factores de virulencia de las bacterias. Alguna deficiencia en cualquiera de estos autoinductores hace a la bacteria menos patógena (Pearson et al., 2000; Kipnis et al., 2006)

d) La *biopelícula* es una estructura donde microcolonias de la bacteria se adhieren a superficies, a través de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que están conformadas por polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. Dicha matriz disminuye la incorporación de compuestos tóxicos para la bacteria, como los antibióticos y moléculas de defensa del huésped (Rasamiravaka et al., 2014)

e) *P. aeruginosa* produce al menos tres *polisacáridos*: alginato, Pel y Psl, los cuales determinan la estabilidad de la biopelícula. El alginato es un polímero lineal de D-ácido manurónico y L-ácido gulorónico, el cual permite la estabilidad, protección y retención de agua y nutrientes (Ryder et. al. 2007). El polisacárido Pel es una matriz rica en glucosa que aun no esta descrita del todo (Sutherland, 2001) y Psl es una secuencia repetida de pentasacáridos de D-manosa, L-ramnosa y D-glucosa (Friedman y Kolter, 2004). Pel y Psl sirven como estructura primaria para la adhesión y formación de la biopelícula. (Franklin et al., 2011). El ADN extracelular proveniente de bacterias muertas, sirve como provision durante la escases de nutrientes, para interconectar a las células y como señuelo frente a las ADNasas I del hospedero.

f) *Diversas proteasas* secretadas por *P. aeruginosa*, le permiten degradar inmunoglobulinas y fibrina, así como desestabilizar las uniones estrechas celulares. En las infecciones respiratorias las proteasas provenientes de este patógeno, contribuyen a la degradación del líquido surfactante y al daño tisular (Fleiszing y Evans, 2002; Kipnis et al., 2006). La proteasa alcalina es una metaloproteasa de zinc, la cual degrada proteínas y fibronectina (Laarman et al., 2012), además se ha descrito que sirve como inhibidor en la vía de señalización del reconocimiento

celular vía TLR5, al degradar a la flagelina y evitar ser reconocida por el sistema inmune (Bardoel *et al.*, 2011). Adicionalmente esta bacteria produce dos elastasas; LasA y LasB. LasA es una proteasa de serina, la cual hidroliza las uniones del peptidoglicano desestabilizando la pared celular de las bacterias. LasB degrada la proteína de opsonización A y D presentes en el líquido surfactante (Mariencheck *et al.*, 2003). La proteasa IV es una serina proteasa que degrada proteínas del complemento, inmunoglobulinas y fibrinógeno, además de inhibir el reconocimiento por los macrófagos alveolares permitiendo la supervivencia durante la infección.

g) *Los lipopolisacáridos* son un complejo glucolipídico que forma parte de la membrana externa y sirve como antígeno en la respuesta inmune, en el transporte de moléculas dentro y fuera de la bacteria y mediando la interacción con antibióticos (King *et al.*, 2009). *P. aeruginosa* produce el lipopolisacárido que consta de tres dominios; anclado a la membrana interna el lípido A, una región que forma parte del núcleo y una región hipervariable de polisacárido O-específico (antígeno O).

h) La *exotoxina A* inhibe la síntesis de proteínas y favorece la muerte celular, reprimiendo la respuesta inmune al disminuir la secreción de citocinas. Las lipasas y las fosfolipasas degradan los lípidos surfactantes y fosfolípidos de las membranas celulares del hospedero, al igual que el líquido surfactante pulmonar, del cual el 90% son lípidos, aumentando la tensión superficial (Holm *et al.*, 1991).

i) Los pigmentos como: la *piocianina* causa estrés oxidativo a las células hospederas, interfiriendo con las catalasas y el transporte de electrones en la mitocondria (Lau *et al.*, 2004), también se ha reportado que induce la apoptosis de los neutrófilos e inhibe la fagocitosis de los macrófagos (Lau *et al.*, 2005), además modula la expresión de la quimiocinas IL-8 y RANTES de las células de tejido epitelial de las vías respiratorias (Denning *et al.*, 1998) y la *pioverdina* que es un quelante de hierro, es otro pigmento que favorece la invasividad de la bacteria al capturar el hierro del huésped.

j) La *resistencia antimicrobiana* de *P. aeruginosa* a diversos antibióticos es bien conocida y existen varios mecanismos que participan en este fenómeno de resistencia múltiple, como lo son: las bombas de expulsión, las β -lactamasas y AmpC (Strateva y Yordanov, 2009). Fármacos como cloranfenicol, fluoroquinolonas, macrólidos, novobiocinas, sulfonamidas, tetraciclinas, trimetoprim y aminoglucosidasas son eliminadas por las bombas de expulsión; y las β -Lactamasas que hidrolizan los β -lactámicos como las penicilinas y cefalosporinas.

En la figura 4 se muestran los diversos factores de virulencia que tiene *P. aeruginosa* y sus efectos en la mucosa pulmonar.

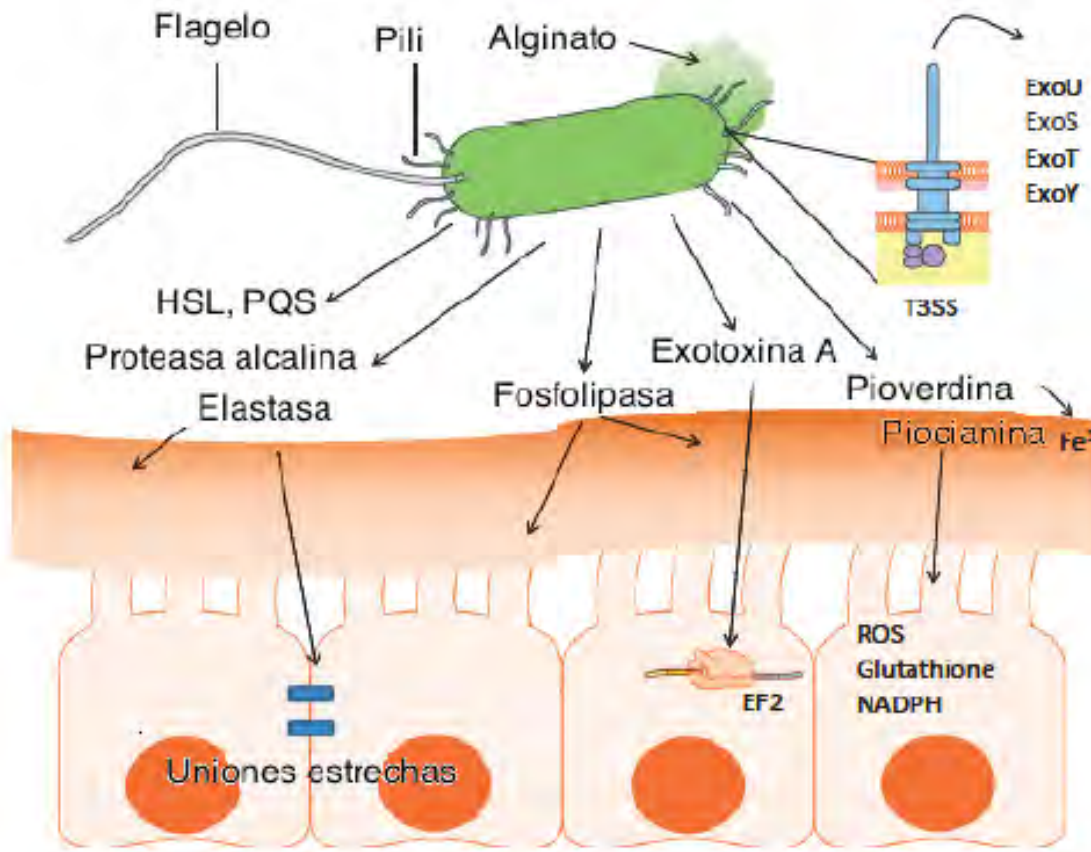


Figura 4. Factores de Virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*. El bacilo tiene un flagelo, pili y produce alginato para favorecer su movimiento y adhesión a las superficies; produce enzimas como las elastasas, fosfolipasa y exotoxinas A que destruyen las uniones estrechas celulares e interrumpen el proceso de transcripción; pigmentos como la píoverdina y píocianina que capturan hierro y favorecen la disrupción del tejido; moléculas que señalizan para el sistema sensor de Quorum (HSL y PGS); así como, un sistema de secreción T3SS (Sistema de Secreción Tipo 3) que favorece su proceso de unión e infección de células.

Modificado de Gellatly y Hancock, 2013.

3.5.1 INFECCIONES PULMONARES OCASIONADAS POR *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es uno de los principales causantes de infecciones respiratorias y que afectan un gran número de pacientes hospitalizados, dichas infecciones se clasifican en agudas y crónicas. Las infecciones agudas son causadas generalmente por traumas en el epitelio debido a la intubación u agentes irritantes. Las infecciones crónicas son el resultado de una respuesta inmune deficiente, debido a las condiciones clínicas del paciente por ejemplo los ancianos y pacientes con fibrosis quística (FQ) (Gellatly y Hancock, 2013).

Las células del sistema inmune encargadas de controlar la infección son los neutrófilos al degranularse, el macrófago a través de la fagocitosis y secreción de

citocinas proinflamatorias y las células dendríticas, estas últimas también actúan como células presentadoras de antígenos, lo cual contribuye al desarrollo de la inmunidad adaptativa con la participación de los linfocitos T y linfocitos B, sin embargo una respuesta descontrolada puede favorecer el desarrollo de la infección y su progresión a procesos crónicos (Lavoie et al., 2012)

Los procesos infecciosos agudos ocasionados por procesos quirúrgicos como una intubación son debido a que el material empleado sirve como reservorio de *P. aeruginosa*, ya que la bacteria crece en forma de biopelícula en la superficie de plástico. Esta adherencia evita que los fármacos tengan un efecto directo sobre el patógeno, favoreciendo su progresión a una infección crónica (William et al., 2010). Uno de los principales métodos de control de estas infecciones son las terapias farmacológicas que permiten la prevención y/o eliminación de la biopelícula (Gellatly y Hancock, 2013).

En las infecciones crónicas *P. aeruginosa*, los factores de virulencia, le permiten a la bacteria adaptarse al ambiente pulmonar creciendo en forma de biopelícula resultando en una infección crónica, los casos mejor conocidos son los pacientes de FQ, los cuales tienen una mutación en el receptor regulador transmembranal de fibrosis quística, un canal de cloro dependiente de cAMP (Williams et al., 2010) resultando en la deshidratación y adelgazamiento del liquido surfactante. La delgadez del liquido surfactante debilita la respuesta inmune (Sandikot et al., 2005) aunada a una persistente estimulación inmunológica por la bacteria y la deficiencia del huésped en controlar la inflamación resulta en inflamación crónica pulmonar. La destrucción de la función pulmonar junto con la respuesta hiperinflamatoria, exacerbada con las toxinas bacterianas, causan la deterioración progresiva de la función pulmonar y finalmente hace que la infección sea fatal (Blohmeke et al., 2012).

Otras patologías asociadas a infecciones crónicas pulmonares ocasionadas por *P. aeruginosa* son la bronquiectasia crónica y enfermedad crónica obstructiva pulmonar (COPD). La bronquiectasia crónica es la dilatación irreversible de las vías bronquiales causadas por la obstrucción de los tejidos musculares, usualmente desemboca en una infección respiratoria severa y es restringida al lóbulo en la cual originalmente se produjo (Gellatly y Hancock, 2013).

La COPD se genera por una inflamación crónica del tejido pulmonar y que desemboca en una disminución de la función pulmonar, el humo del tabaco es considerado como factor de riesgo para desarrollar COPD debido que los químicos contenidos en el cigarro impiden una regulación adecuada de la repuesta del sistema inmune (Povinciali et al., 2011).

En la figura 5 se describe la respuesta inmune que se presenta cuando *P.*

aeruginosa ingresa a tejido pulmonar.

Figura 5. Mecanismo de infección de *Pseudomonas aeruginosa* en el tracto respiratorio. La generalidad del proceso de infección de la bacteria y la respuesta del sistema inmune en el tejido pulmonar consiste en: a la llegada de la bacteria a tejido pulmonar las primeras barreras que enfrenta son el líquido surfactante y el aclaramiento ciliar y los macrófagos residentes del tejido que monitorean la llegada de agentes patógenos, una vez que fueron identificados por los macrófagos y las células epiteliales a través de los TLR's, las células activarán la cascada de inflamación vía NFkB secretando interleucinas como IL-6 e IL-8, las cuales favorecen la llegada de los neutrófilos, los cuales a su llegada se degranularán lo que provoca que enzimas, péptidos antimicrobianos y compuestos oxidativos, dañen a la bacteria y al tejido. Por otro lado las células presentadoras de antígenos como los macrófagos estarán fagocitando las bacterias tratando de contenerlas y secretando IL-1, que permitirán la llegada de células dendríticas y de linfocitos para llevar a cabo la respuesta inmune adaptativa generando memoria y favoreciendo la producción de anticuerpos.

Modificado de Gellatly y Hancock, 2013

4. ANTECEDENTES

Los organismos multicelulares están permanentemente expuestos a miles de microorganismos potencialmente patógenos. La inmunidad innata constituye una primera línea de defensa para contener estos microorganismos. Una parte importante de la inmunidad innata es un grupo de péptidos con actividad antimicrobiana, denominados péptidos antimicrobianos (AMP's). Los AMP's son muy heterogéneos en longitud, secuencia y estructura, pero la mayoría de ellos son pequeños, catiónicos y anfipáticos. Estos péptidos presentan un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas; levaduras, mohos y virus (Smet, 2005). Sin embargo, existen una gran variedad de proteínas humanas que también han sido descritas con actividad antimicrobiana, además de jugar un papel importante en la inmunidad innata; entre ellas se encuentran las quimiocinas.

El análisis de la actividad antimicrobiana de las quimiocinas ha permitido la síntesis de péptidos derivados de éstas, con la finalidad de entender las regiones y estructuras adoptadas en relación a su actividad antimicrobiana y su eficacia contra los diferentes microorganismos. El péptido derivado de la quimiocina CCL-13 perteneciente a la región carboxilo-terminal, denominada CDAP-4 (Chemokine Derived Antimicrobial Peptide 4) fue reportada en el 2007 por Martinez-Becerra y col., como uno de los péptidos con mayor actividad antimicrobiana frente a las cepas Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* ATCC 25922 no patogénica y *Escherichia coli* ATCC 39403 resistente a β -lactámicos.

CDAP-4 es un péptido de 19 aminoácidos con la secuencia KWVQNYMKHLGRKAHTLKT, un peso molecular de 23339,79 y un punto isoeléctrico de 1,58. No tiene una configuración tridimensional en solución salina, sin embargo, en presencia de LPS de *E. coli* adopta la conformación de α -hélice, muy similar a la de las defensinas (Cossio-Ayala, et.al, 2017). Su actividad *in vitro* ha sido probada en cepas de referencia como en aislados clínicos manteniendo su actividad antimicrobiana, en condiciones de osmolaridad elevada y un intervalo de pH de entre 4 – 8 en cepas de *E. coli* diarrogénicas (Hernández et al., 2003). Además, su toxicidad contra eritrocitos humanos es nula (Cossio-Ayala, et.al., 2017).

Debido a las características del péptido mencionadas anteriormente y las ventajas sobre otros péptidos antimicrobianos, como las defensinas, se desarrollo un modelo *in vivo* que permitió evaluar su actividad antimicrobiana contra uno de los patógenos mayoritariamente afectados, *P. aeruginosa*. El modelo consistió en generar una infección aguda pulmonar en ratones C57BL/6 y tratados con una sola

dosis de CDAP-4 vía intratraqueal, 24 h previas al sacrificio del ratón, mostrando: que el péptido rescataba de la muerte a los ratones infectados; la disminución de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) bacterianas en los pulmones homogenizados; y los cortes histológicos del tejido pulmonar mostraron una disminución en el infiltrado celular de los ratones tratados con CDAP-4 respecto a los tratados con solución salina (Cossio-Ayala, et.al., 2017).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día la incidencia y prevalencia de *P. aeruginosa* es de suma importancia en los hospitales de México, debido al enorme gasto económico generado por las infecciones nosocomiales asociadas a este patógeno, ya que es uno de los principales responsable de este tipo de enfermedades, en pacientes quemados, pacientes con catéter, pacientes inmunosuprimidos y pacientes con fibrosis quística (Espinoza-Lopez, 2014).

La formidable capacidad de *P. aeruginosa* para adaptarse a condiciones adversas a través del uso de sus factores de virulencia, siendo uno de los más importantes: la producción de biopelícula, que favorece la progresión de un cuadro infeccioso agudo en uno crónico, aunado a la resistencia natural contra antibióticos y el fenómeno de selección de resistencia de las cepas (Lambert, 2002) las terapias farmacológicas actuales se ven sobrepasadas al no existir fármacos adecuados que controlen las infecciones de manera eficaz.

La tendencia en el diseño y síntesis de nuevas fármacos con actividad antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, sugiere que las moléculas deben ser capaces de evadir los factores de virulencia y/o controlar su producción, evitando la progresión a cuadros infecciosos crónicos, además de favorecer la resolución de las infecciones crónicas ya establecidas.

6. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad las infecciones generadas por las cepas de *P. aeruginosa* han recobrado importancia debido a su incidencia y prevalencia en infecciones nosocomiales, sobre todo asociadas a pacientes con catéter, quemados, y aquellos que padecen fibrosis quística. Todos ellos con la similitud de contar con un sistema inmune deprimido (Espinoza-Lopez, 2014).

Las cepas aisladas con mayor frecuencia en los pacientes quemados y con catéter presentan el fenotipo mucóide, es decir, con la capacidad de producir biopelículas que favorecen la invasividad del patógeno agravando los cuadros infecciosos y promoviendo su evolución a cuadros crónico (Pereira et al., 2014). Los tratamientos contra estas cepas suelen ser mas complicados pues dicho factor de virulencia les permite resistir a ciertos antibióticos como los β -lactámicos (Ben Haj et al., 2011).

Además, la biopelícula le permite a las bacterias evadir la respuesta del sistema inmune, como es el caso de los macrófagos al impedir su fagocitosis y evitando que se lleve a cabo la presentación de antígenos y por lo tanto evite la activación de la respuesta inmune adaptativa. Asimismo los neutrófilos no pueden eliminar a este patógeno debido a que su batería enzimática difícilmente entra en contacto con la bacteria ya que la biopelícula funciona como una barrera física (Rasamiravaka et al., 2014).

La capacidad de *P. aeruginosa* para adaptarse y supervivir a diferentes condiciones de crecimiento, ha obligado que las terapias farmacológicas actuales tengan que ser adaptadas constantemente, por la resistencia natural de *P. aeruginosa* y al fenómeno de selección de cepas resistentes. Por otro lado, el cambio de fenotipo también ha sido reportado para el caso de pacientes con fibrosis quística, cepas aisladas de pacientes con el fenotipo mucóide, al cultivarlas in vitro es cambiado a no mucóide (Ortiz-Herrera et al., 2004).

La búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas ha llevado al desarrollo de nuevos fármacos para mejorar los tratamientos existentes. Los péptidos antimicrobianos han retomado importancia por su variabilidad estructural y su mecanismo de acción (Steckbeck et al., 2014). Dentro de los péptidos antimicrobianos que podemos considerar como emergentes están aquellos que son sintetizados a partir de moléculas existentes de manera natural en los diferentes seres vivos.

En el año 2000 las quimiocinas fueron descritas como moléculas con actividad antimicrobiana, representando un nuevo grupo de moléculas de gran interés farmacológico, por su potencial antimicrobiano. La búsqueda de las regiones involucradas con tal actividad favoreció: la síntesis de péptidos derivados de las regiones amino y carboxilo terminal, el descubrimiento de péptidos derivados de quimiocinas con actividad antimicrobiana cuando la quimiocina completa carece de la actividad antimicrobiana y péptidos con potencia antimicrobiana superior al de la quimiocina completa; algunas de ellos son: los péptidos derivado de CXCL4 (Kotarsky et al., 2010), derivados de IL-8 (Björstad et al., 2005) y el derivado de CCL13 (Martinez-Becerra et al., 2007).

CDAP-4 es un péptido antimicrobiano derivado de la quimiocina CCL13 que tiene actividad antimicrobiana mayoritariamente contra cepas bacterianas Gram negativas, como la *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas sp.*, etc. (Martinez-Becerra et al., 2007). Debido a las bajas concentraciones para alcanzar la eliminación e inhibición bacteriana; resistencia a condiciones de pH y concentraciones de sales; y la poca toxicidad, se evaluó la actividad *in vivo*, en un modelo murino de infección pulmonar agudo provocado por *P. aeruginosa*, se administró el péptido vía intratraqueal, resultando en la disminución de la muerte de los ratones y favoreciendo el control de la enfermedad hasta su resolución, quedando establecido que el péptido mantiene su actividad antimicrobiana en un modelo *in vivo* (Cossio-Ayala, et.al., 2017).

Debido a que las infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* del fenotipo mucoide desencadenan cuadros crónicos y son de difícil tratamiento, aunada a su reciente selectividad de las cepas resistentes a las terapias farmacológicas actuales y la falta de tratamientos definitivos en la eliminación del patógeno; el desarrollo de modelos crónicos de infección y la búsqueda de terapias que permitan el control y la resolución de la infección es de suma importancia en México.

El empleo de CDAP-4 como posible terapia en un modelo de infección pulmonar crónico con resultados favorables es muy probable, ya que su actividad *in vitro*, así como su actividad *in vivo* en un modelo agudo, respaldan la posibilidad de la efectividad del péptido.

7. HIPÓTESIS

El péptido CDAP-4 tendrá actividad antimicrobiana en un modelo de infección crónica pulmonar generado por *Pseudomonas aeruginosa*, favoreciendo la respuesta inmune y la resolución de la infección.

8. OBJETIVOS

8.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antimicrobiana de CDAP-4 en un modelo crónico de infección *in vivo* y en pruebas *in vitro* con cepas de diferentes fenotipos de *Pseudomonas aeruginosa*.

8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de CDAP-4 obteniendo la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) en cepas de fenotipo mucoide, no mucoide y susceptible a cambiar de fenotipo de *P. aeruginosa*.

Evaluar el efecto de CDAP-4 sobre la generación de biopelícula en cepas de fenotipo mucoide, no mucoide y susceptible a cambiar de fenotipo de *P. aeruginosa*.

Desarrollar un modelo murino de infección pulmonar crónica por *P. aeruginosa* a través del encapsulamiento de las bacterias en perlas de agarosa.

Analizar el efecto de CDAP-4 sobre el modelo crónico de infección contabilizando las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes en los grupos tratados comparando con los no tratados.

Describir las modificaciones generadas por la infección crónica en el tejido pulmonar a nivel morfológico y de poblaciones celulares del sistema inmune en presencia y ausencia de CDAP-4

9. MATERIALES Y METODOS

9.1 Cepas empleadas y mantenimiento de las cepas

Las cepas empleadas durante la realización del trabajo fueron: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 (PAO1), cepa de referencia cuyo genoma fue recientemente identificado en el año 2000 (Stover et al., 2000) y que es susceptible a adoptar el fenotipo mucóide; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 39324 (MUC), la cual es una cepa aislada de un paciente con fibrosis quística y se obtuvo en la ATCC como una cepa de referencia de *P. aeruginosa* con el fenotipo mucóide, es decir productora de alginato principal componente de la biopelícula (Pier, Matthews, & Eardley, 1983) y la cepa *Pseudomonas aeruginosa* AlgC⁻, la cuál tiene una mutación en el gen *AlgC* que codifica para la proteína que regula la síntesis de alginato y de lipopolisacáridos (Zielinski et al., 1991) por ello su fenotipo no es mucóide. El aislado clínico 5278, proveniente del Instituto Nacional de Cardiología, proveniente de una infección gastrointestinal y con fenotipo mucóide; y las cepas 74, 84 y 87 que fueron aisladas en heridas de pacientes quemados en el Hospital del IMSS Clínica No. 220 del Estado de México.

Todas las cepas de *P. aeruginosa* mencionadas fueron cultivadas en medio Luria Bertani (LB) a 37 °C con una agitación de 250 rpm durante 24 h, posteriormente se centrifugaron a 2 500 x g, se reemplazó el sobrenadante por medio fresco LB con DMSO al 10% y se congelaron a -70 °C para su mantenimiento y uso posterior. Para el manejo de las cepas se utilizó una campana de bioseguridad nivel 2.

9.2 Curvas de crecimiento

Se tomó 10 µL del stock de bacterias de -70 °C y cultivaron en medio LB durante 24 h a 37 °C a 2 500 x g; posteriormente se tomaron 100 µL del cultivo, los cuales se sembraron en 100 mL de medio LB, después se realizaron 10 alícuotas de 10 mL en tubos de 15 mL, los cuales se pusieron a incubar a 37 °C a 250 rpm durante 8 horas. Cada hora fue retirado un tubo, el cual fue centrifugado a 2 500 x g y se resuspendió en el mismo volumen de PBS 1 X. Se determinó la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro marca Ultrospec II CKB Biochrom.

9.3 Suspensión bacteriana

Se tomaron 10 μ L del stock de bacterias de -70 °C y se colocaron en 10 mL de medio LB durante 24 h a 37 °C a 200 rpm. Después se tomaron 50 μ L de la suspensión bacteriana de crecimiento y se llevaron a 10 mL de medio LB, se incubaron de 4-5 h y procedió a ajustar la absorbancia a 0.500 en una longitud de 620 nm (aproximadamente 6.1×10^8 UFC/mL), inmediatamente después se colocó en hielo hasta su uso.

9.4 Obtención del Péptido Derivado de Quimiocina 4 (CDAP-4)

El péptido fue sintetizado y purificado por la empresa ANASPEC reportando la pureza del péptido en > 98%, empleando el método de HPLC.

9.5 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se realizó por el método de la microdilución en caldo en base a la Norma CLSI M7-A6 y la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), Anexo 1. Brevemente, en una placa de poliestireno de 96 pozos de fondo redondo se realizaron diluciones dobles del tratamiento a probar en 50 μ L, para CDAP-4 se partió de una concentración de 109,1 μ M hasta 10,4 μ M y para la amikacina de 13.6 - 0.4 μ M, para un volumen final de 60 μ L, posteriormente se agregó 10 μ L de una suspensión bacteriana con 5×10^5 UFC/mL por pozo, ver esquema de preparación de placa en el Apéndice 1. Dicha placa se incubó 24 h a 37 °C, transcurrido el tiempo se observó y reportó la CMI como la concentración menor donde no se observó crecimiento bacteriano a simple vista.

9.6 Concentración Mínima Bactericida (CMB)

En una placa de 96 pozos de poliestireno de fondo redondo se realizaron diluciones dobles del tratamiento a probar en 50 μ L, para CDAP-4 se partió de una concentración de 109,1 μ M hasta 10,4 μ M y para la amikacina de 13.6 - 0.4 μ M, para un volumen final de 60 μ L, posteriormente se agregó 10 μ L de una suspensión bacteriana con 5×10^5 UFC/mL por pozo, se incubó durante 48 h. Posterior a la incubación se tomaron 10 μ L de los pozos donde no se observó crecimiento a simple vista, se procedió a realizar diluciones y sembrar en placas de agar LB por la técnica del goteo (gotas de 10 μ L), se incubaron por 24 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo se contabilizaron las UFC que crecieron. Se reporta como CMB la concentración donde el 99.9 % de las colonias fueron inhibidas respecto al control. La fórmula empleada para obtener el porcentaje de inhibición del crecimiento fue:

$$\% \text{ de inhibición} = \left[\frac{\left(\frac{C_{\text{tratamiento}}}{(FD_{\text{tratamiento}})(V_{\text{tratamiento}})} \right) (100\%)}{\frac{C_{\text{control}}}{(FD_{\text{control}})(V_{\text{control}})}} \right]$$

En las diferentes condiciones:

C= Número de UFC

FD= Factor de Dilución

V= Volumen sembrado en mL

9.7 Evaluación del efecto de CDAP-4 sobre la biopelícula de *P. aeruginosa*

La evaluación realizada para cuantificar el efecto de CDAP-4 sobre la biopelícula se realizó con tres variantes, su efecto en: la adhesión de la bacteria para la formación de la biopelícula (prevención), en la formación y establecimiento de la biopelícula (generación) y sobre la biopelícula ya formada.

Para la primera condición (prevención) una placa de poliestireno de 96 pozos con fondo redondo fue recubierta con diferentes concentraciones de CDAP- 4 por pozo, con concentraciones de 109,1 μM (256 $\mu\text{g/mL}$) hasta 3,4 μM (256 $\mu\text{g/mL}$), como se muestra en el Apéndice 2, se dejó incubar en agitación durante 24 h a 4 $^{\circ}\text{C}$, posteriormente se retiró el sobrenadante y se colocó con 100 μL de medio LB y 50 μL de una suspensión bacteriana con 5×10^5 UFC/mL por pozo y se incubó durante 24 h, sin agitación a 37 $^{\circ}\text{C}$. Para su tinción se retiró el sobrenadante.

En el caso de la evaluación de CDAP-4 sobre la generación se emplearon placas de 96 pozos de fondo redondo, las cuales fueron llenadas con 100 μL de medio LB que contenía diferentes concentraciones de CDAP-4 (109,1 μM - 3,4 μM), ver Apéndice 2; y 50 μL de una suspensión bacteriana con 5×10^5 UFC/mL, se incubó durante 24 h, sin agitación a 37 $^{\circ}\text{C}$. Posteriormente a su incubación se retiró el sobrenadante para su tinción.

El efecto de CDAP-4 sobre la biopelícula formada se evaluó en placas de 96 pozos de fondo redondo, en las cuales se depositaron 150 μL de una suspensión bacteriana con una concentración de 5×10^5 UFC/mL, se incubó durante 24 h a 37 $^{\circ}\text{C}$, sin agitación. Posteriormente se retiró el sobrenadante, con cuidado de no retirar la biopelícula formada, posteriormente se agregaron 150 μL de una solución con CDAP-4 en concentraciones de 109,1 μM hasta 3,4 μM , se incubó durante 24 h, sin agitación a 37 $^{\circ}\text{C}$. Finalmente se retiró el sobrenadante para su posterior

tinción.

9.8 Tinción con Cristal Violeta (CV) para cuantificar biopelícula

Una vez obtenida la biopelícula a medir, se retiró el sobrenadante de la placa de poliestireno de 96 pozos y se dejó secar por dos horas a 37 °C. Una vez secas se colocaron 150 µL de Cristal Violeta (CV) al 0.1 % (w/v) y se tiñó durante 15 minutos, posteriormente se retiró el CV y se lavó con 300 µL de solución salina 2 veces. Las placas se dejaron secar completamente a temperatura ambiente y posteriormente se agregaron 150 µL de etanol absoluto y llevaron a un lector óptico. La absorbancia se midió a 540 nm, indicando si hubo formación de biopelícula.

9.9 Encapsulamiento de *P. aeruginosa* en perlas de agarosa

En un matraz se colocó 2 mL de medio TSB (Tryptic Soy Broth / Agar Soya Tripticaseína) con aproximadamente 5×10^{11} UFC/mL de MUC, en 50 mL de aceite mineral y 8 mL de agarosa fundida, previamente calentados a 50 °C, se agitó vigorosamente en una plancha de agitación durante 6 minutos. La emulsión se colocó en un tubo falcón de 50 mL, se centrifugó durante 30 minutos a 2 500 x g, se quitó el aceite mineral y procedió a realizar los lavados. Para los lavados, se agregaron 20 mL de SDC (Dodecilsulfato sódico) al 0,5 %, se agitó y centrifugó a 2 500 x g, posteriormente se retiró el sobrenadante y colocaron 20 mL de SDC 0,25 %, se agitó y centrifugó a 2 500 x g, se retiró el sobrenadante y se realizaron tres lavados más con PBS (Phosphate buffered / tampón fosfato salino) 1 X bajo las mismas condiciones. Finalmente se resuspendió en 15 mL de PBS 1 X y se mantuvo a 4 °C hasta su uso (van Heeckeren y Schlucher, 2002). La cantidad de bacterias contenidas en las perlas fueron cuantificadas al triturarlas y sembrando la suspensión en agar LB.

9.10 Cuantificación del tamaño de las perlas

Una vez preparadas las perlas de agarosa, se montaron para ser vistas al microscopio. Brevemente en un portaobjetos se colocaron 20 µL de la suspensión de las perlas y encima se colocó un cubre objetos el cual fue sellado con barniz, posteriormente se observó en un microscopio de contraste de fases Zeiss con objetivos 40X y 60X; y se tomaron fotografías. Las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ. Se cuantificaron 100 perlas por laminilla, midiendo el diámetro de cada perla, tomando como referencia las escalas del programa y del objetivo empleado.

9.11 Infección de los animales

Se procedió a anestésicar a los ratones en una cámara de gas con Sevoflurano por 30 segundos, posteriormente con una cánula para alimentar ratones Popper de 2.54 cm con punta redonda se inocularon 50 μL de la suspensión de trabajo para inocular a los ratones vía intra-traqueal. Las suspensiones de trabajo empleadas fueron: perlas de agar y perlas con $3\text{-}5 \times 10^6$ UFC/mL aproximadamente de *P. aeruginosa* (MUC).

9.12 Modelo murino de infección crónica

Para establecer el modelo se emplearon ratones machos de entre 6 y 8 semanas de edad, de la cepa C57BL/6, con alimento y agua estéril *ad libitum*, en las instalaciones del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas y de acuerdo a las normas del Comisión del Bioterio del mismo, por lo que se planteó el siguiente diseño experimental.

Se emplearon cuatro grupos con los siguientes tratamientos: 1) Perlas de agarosa; 2) Perlas de agarosa con MUC y tratados con solución salina; 3) Perlas de agarosa con MUC y tratados con CDAP-4; y 4) Perlas de agarosa con MUC y tratados con Ciprofloxacino. Cada grupo con 25 ratones, repartidos en 5 tiempos diferentes: día 0, día 3, día 7, día 14 y día 21. Los tratamientos consistieron en la administración vía intratraqueal, 24 h previas a su sacrificio, es decir el día 2, 6, 13 y 20 fueron administrados con: 50 μL de solución salina, 200 μg de CDAP-4 en 50 μL y 0.250 μg de Ciprofloxacino en 50 μL para cada grupo respectivamente.

Para el análisis del efecto de CDAP-4 en el modelo de infección murino, se emplearon tres animales para la cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y dos para el análisis histológico. Como se muestra en la siguiente figura 6.

Figura 6. Modelo murino de infección crónica

9.13 Contabilización de UFC en tejido pulmonar

Una vez anestesiado el ratón con 50 µL de una solución de ketamina/xilacina (2:1), se le extrajo la sangre por punción intracardíaca, para evitar que el tejido pulmonar se dañara. Se aplicó la eutanasia por dislocación cervical para extraer los 2 lóbulos pulmonares, los cuales fueron colocados en 600 µL de PBS 1 X, para su posterior homogenizado. Posteriormente se realizaron diluciones decimales, se plaquearon 10 µL en agar *Pseudomonas* Isolation Agar (PIA), se incubaron durante 24 h a 37 °C. Transcurrido ese tiempo se procedió a realizar el conteo de las UFC. Aplicando la siguiente fórmula se contabilizaron las UFC por gramo de tejido pulmonar.

$$UFC / g = \left[\frac{\left(\frac{C}{(FD)(V)} \right)}{P} \right]$$

C= Numero de UFC

FD= Factor de Dilución

V= Volumen en mililitros

P= Peso del tejido pulmonar en gramos

9.14 Análisis Histológico e Histoquímico del tejido pulmonar

Se anestesió el ratón con 50 µL de una solución de ketamina/xilacina (2:1) vía intraperitoneal, se extrajo su sangre por punción cardíaca, y se procedió a disectar la parte torácica y cuello para descubrir los pulmones y tráquea. Se realizó una incisión en la tráquea e insertó una cánula plástica, a través de la cual se perfundieron los pulmones con 1,0 mL de Formalina al 10 %. Se selló la tráquea y procedió a extraer los pulmones que posteriormente se sumergieron en 7 mL de Formalina al 10%, hasta su inclusión en parafina.

La obtención de los cortes de parafina (5 µm); el montaje y tinciones de los tejidos (Hematoxilina/Eosina (H/E) sobre las laminillas se realizó en la unidad de Técnicas Histológicas para Microscopia Fotónica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la supervisión del Dr. César E. Montalvo.

9.15 Análisis Morfométrico del tejido pulmonar

Los tejidos teñidos con Hematoxilina/Eosina (H/E) fueron los empleados en el análisis morfométrico, para el cual se utilizó el analizador de imágenes Leica DM750 acoplado al microscopio ZIDAS (Zeiss Interactive Digital System), en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Subirán en el Departamento de Patología Experimental bajo la supervisión del Dr. Rogelio Hernández Pando.

9.16 Análisis de las poblaciones celulares en lavados bronqueoalveolares (LBA)

Los lavados bronqueoalveolares (LBA) se realizaron en animales a los que previamente les fue extraída sangre por punción cardíaca, posteriormente se disectó el cuello dejando al descubierto la tráquea, por la que se insertó una cánula plástica acoplada a una jeringa, la cual contenía un 1 mL de solución salina, que fue introducida a los pulmones y extraída con la misma jeringa. Éste procedimiento se realizó hasta obtener un volumen de 5 mL. Los lavados se trataron con 2 mL de solución de lisis, durante 3 minutos en frío, posteriormente se centrifugaron (2 500 x g) y lavaron con PBS 1X.

Los células extraídas del LBA fueron contabilizadas a través de la técnica de citometría de flujo. Las células se dividieron en tres pocillos en una placa de poliestireno de 96 pozos, cada pozo quedo con aproximadamente 20 mil células viables para realizar el marcaje de acuerdo a cada linaje celular buscado. Los marcadores empleados para el marcaje fueron: en el pozo uno para macrófagos F4/80 y linfocitos B CD19; en el pozo dos para neutrófilos GR1 Y CD11 b; y en el pozo tres se colocaron los marcadores CD3, CD4 y CD8 para linfocitos cooperadores y citotóxicos. Los cromóforos acoplados a cada marcador, así como, las concentraciones en las que fueron empleados y los canales usados para su lectura en el citómetro se describen en el Anexo 2.

9.17 Análisis estadístico

El análisis estadístico consistió inicialmente en determinar la normalidad de los datos mediante una prueba de Kolmogorov-Smirlov, posteriormente para encontrar las diferencias significativas entre los grupos analizados se uso una prueba de Anova de dos colas y posteriormente la prueba post-hoc Turkey con una $P < 0.05$.

10. RESULTADOS

10.1 CURVAS DE CRECIMIENTO

Las condiciones óptimas de crecimiento de las cepas bacterianas en medio LB empleadas fueron estandarizadas y obtenidas a través de las curvas de crecimiento de cada una de ellas. Debido a que cada cepa tiene requerimientos especiales y condiciones de crecimiento específicas, se determinaron sus curvas de crecimiento con medio LB completo a 37 °C con agitación rotatoria a 200 rpm. Se calculó el tiempo que tardan en alcanzar la fase logarítmica de crecimiento (fase log) de cada cepa de referencia empleada, PAO 1 (ATCC 1569 cepa de referencia de *P. aeruginosa* no productora de biopelícula en condiciones estándar), MUC (ATCC 39324 cepa de referencia de *P. aeruginosa* productora de biopelícula en condiciones estándar) y AlgC- (cepa mutante de *P. aeruginosa* AlgC, no productora de alginato, principal componente de la biopelícula). En la figura 7 se muestran las respectivas curvas de crecimiento de cada una de las cepas antes mencionadas, PAO1 es la cepa más rápida en iniciar la fase logarítmica (3.5 h) y de mayor absorbancia, seguida por la cepa MUC (4 h) generadora de biopelícula (mucoide) y finalmente por la cepa AlgC- (5 h) no productora de biopelícula (no mucoide). De acuerdo a dichos tiempos se estableció que en promedio 4.2 horas a 37 °C y agitación mecánica a 200 rpm es el inicio de la fase logarítmica de crecimiento para las cepas empleadas, la cual es necesaria para realizar los subsecuentes experimentos.

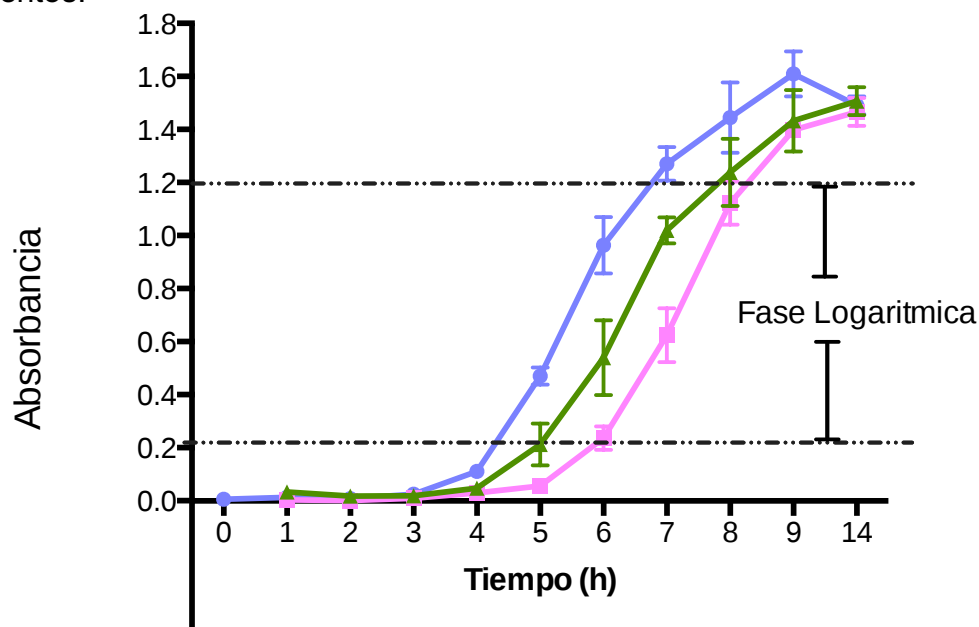


Figura 7. Curvas de crecimiento de diferentes cepas de *P. aeruginosa*. Cepa *P. aeruginosa* PAO1 de color azul, *P. aeruginosa* mucoide en color verde y *P. aeruginosa* no mucoide en color rosa, además muestra la fase logarítmica de crecimiento de las bacterias. Las barras en cada punto indican las desviación estándar de cada tiempo analizado por triplicado.

El tiempo de generación se obtuvo mediante la ecuación de la recta, a partir de la fase logarítmica de la respectiva curva de crecimiento, la cepa que es más rápida en dividirse es la *AlgC-* al tardar 27 minutos, seguida por la MUC (28 min) y finalmente PAO 1 (29 min). A pesar de que PAO1 es la cepa que entra más rápido a la fase logarítmica es la más lenta en dividirse. *AlgC-*, contrariamente a PAO1, es la más lenta en entrar a la fase logarítmica (adaptarse a las condiciones de crecimiento) pero lo más rápida en dividirse. Finalmente la cepa MUC comparada con el resto de las cepas es la que tarda un tiempo intermedio tanto para entrar en fase logarítmica como en su tiempo de división, como lo muestra la tabla 4.

Cepa	Ecuación	Tiempo de generación (min)	Desviación Estándar (DE)
PAO 1	$x = (y + 0.188) / 0.346$	29	0.10
MUC	$x = (y + 0.383) / 0.357$	28	0.23
<i>AlgC-</i>	$x = (y + 0.207) / 0.363$	27	0.26

Tabla 4. Tiempos de duplicación de las cepas empleadas de *P. aeruginosa*. Las cepas empleadas son PAO1 que es susceptible a formar biopelícula, en color azul; la cepa MUC que es formadora de biopelícula, en rosa; y finalmente *AlgC-* que no genera alginato, en color verde. La ecuación de la recta que se obtuvo de la de la fase logarítmica con su respectivo tiempo en minutos y desviación estándar de experimentos realizados por triplicado.

10.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los parámetros por excelencia en la clínica para evaluar la actividad antimicrobiana de un fármaco o principio activo se determinan a través de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB). Se evaluaron las cepas de referencia PAO 1 ATCC 15692, MUC ATCC 39324, *AlgC-* y aislados clínicos provenientes de diferentes centros de salud pública (ver metodología) con la finalidad de evaluar la actividad de CDAP-4 en cepas con fenotipos distintos.

El conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC), para la obtención de la CMI y CMB, se llevó a cabo de manera directa en las placas de agar LB, de acuerdo a la norma de CLSI M7-A6, para considerar una UFC o su descarte, como se muestra en la figura 8.

La CMI de CDAP-4 para las cepas de referencia fue dependiente del fenotipo de la cepa. La cepa de referencia MUC presentó una CMI de 104,12 μM , la cepa PAO1 101,7 μM , y la cepa *AlgC-* 32,8 μM ; para el caso de los aislados clínicos proveniente de pacientes quemados, el aislado 78 con 50,2 μM , para el aislado 84 de 41,1 μM y el aislado 87 de 31,9 μM . A pesar de que el fenotipo de los aislados clínicos es mucoide, su CMI es mucho menor al de la cepa de referencia. Por el contrario, el

aislado proveniente de una sepsis gastrointestinal (aislado clínico 5278) fue mayor a $109\ \mu\text{M}$, la cual supera a la cepa de referencia (MUC). Estos resultados indican que los aislados clínicos provenientes de pacientes quemados tienden a ser más susceptibles al efecto antimicrobiano de CDAP-4, que la cepa de referencia de fenotipo mucóide y al aislado proveniente de una infección gastrointestinal, el cual es más resistente a este péptido que la cepa de referencia, mostrando una diferencia en la susceptibilidad de CDAP-4, con tendencias a depender de la fuente de aislamiento de las cepas.

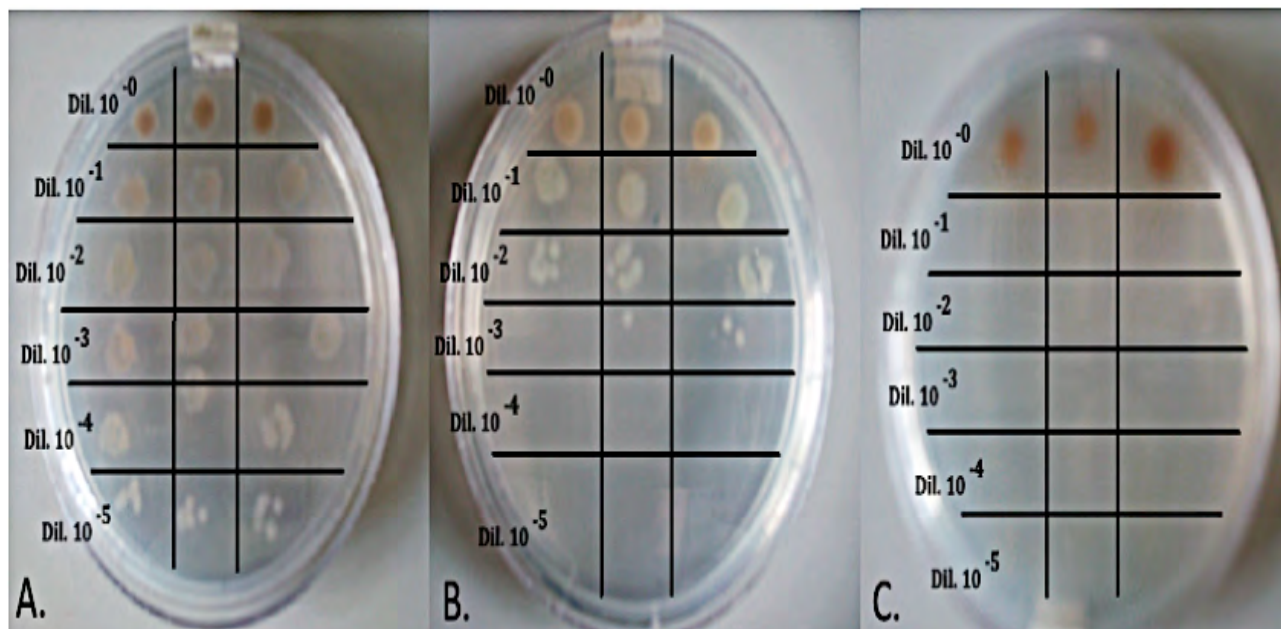


Figura 8. Placas de crecimiento para determinación de la CMI. Las placas muestran la inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 39324 (MUC) en diferentes concentraciones de CDAP-4. A. Diluciones del control de crecimiento; B. Diluciones de la suspensión bacteriana en presencia de $54.5\ \mu\text{M}$ de CDAP-4; C. Diluciones de la suspensión bacteriana en presencia de $109\ \mu\text{M}$ de CDAP-4. Solo las UFC individuales fueron consideradas para el conteo de acuerdo norma de CLSI M7-A6, el resto fueron reportadas como incontables (INC).

En el caso de la CMB se observa que las cepa de referencia mucóide y el aislado clínico 5278 tienen una CMB superior al resto de las cepas empleadas durante el estudio, seguida por la cepa susceptible a ser mucóide con una concentración de $104.1\ \mu\text{M}$, continuando con los aislados clínicos provenientes de los pacientes quemados (AC.87: $65.7\ \mu\text{M}$; AC.78: $60.2\ \mu\text{M}$; AC.84: $43.8\ \mu\text{M}$) y finalmente con la cepa *AlgC-* con $35.6\ \mu\text{M}$. Se presenta el mismo patrón en cuanto a los incrementos y decrementos de las concentraciones que en la CMI, como normalmente sucede con las cepas, las cuales la concentración bactericida es superior a la concentración inhibitoria de crecimiento (Andrews, 2001). En la tabla 5 se muestran los parámetros obtenidos para cada cepa.

Cepa	Fenotipo	CMI		CMB	
		μM (DE)	$\mu\text{g/mL}$ (DE)	μM (DE)	$\mu\text{g/mL}$ (DE)
PAO 1	Susceptible a ser Mucoide	101.7 (± 20.7)	237.7 (± 48.3)	104.1 (± 17.3)	241.7 (± 42.6)
PA ATCC 39324	Mucoide	104.12 (± 32.8)	243.2 (± 40.4)	>109 N/A	>256 N/A
AlgC-	No Mucoide	32.8 (± 12.2)	76.8 (± 28.6)	35.6 (± 13.2)	85.3 (± 32.0)
Aislado Clínico 5278	Mucoide	>109 N/A	>256 N/A	>109 N/A	>256 N/A
Aislado Clínico 78	Mucoide	50.2 (± 11.1)	117.3 (± 26.1)	60.2 (± 17.3)	142.2 (± 42.6)
Aislado clínico 84	Mucoide	41.1 (± 15.0)	96 (± 35.0)	43.8 (± 26.4)	135.1 (± 50.0)
Aislado clínico 87	Mucoide	31.9 (± 11.1)	74.6 (± 26.1)	65.7 (± 23.1)	156.4 (± 56.4)

Tabla 5. Actividad Antimicrobiana de CDAP-4 frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Los parámetros evaluados fueron la CMI y CMB. En la tabla se muestran las concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ y μM del péptido, obtenidas para cada cepa empleada, así como, su desviaciones estándar respectivamente. El experimento se realizó por triplicado. CMI, Concentración Mínima Inhibitoria; CMB, Concentración Mínima Bactericida; DE Desviación Estándar.

10.3 ACTIVIDAD DE CDAP-4 SOBRE LA BIOPELÍCULA

Uno de los factores de virulencia de *P. aeruginosa* que propicia la generación de cuadros crónicos de infección es la formación de biopelícula, por lo que se analizó el efecto de CDAP-4 en la prevención de la formación de la biopelícula (pre-tratamiento de las superficies), la generación de la biopelícula (tratamiento simultáneo) y sobre la biopelícula ya formada (post-tratamiento de la superficie con la biopelícula ya formada), en cepas con el fenotipo mucoide (MUC), no mucoide (AlgC-), y el que es capaz de cambiar su fenotipo a mucoide en condiciones de estrés (PAO1). En la figura 9 se observan los resultados después de analizar el efecto del péptido en las condiciones previamente descritas en diferentes concentraciones de CDAP-4.

Los resultados mostraron que el tratamiento simultáneo, que consistió en evaluar la generación de la biopelícula de *P. aeruginosa* en presencia del péptido de principio a fin del experimento, fue donde se obtuvo el mayor efecto, ya que se inhibió la biopelícula hasta un 80 % con una concentración de 59,5 μM de CDAP-4 para las tres cepas, sin existir diferencia estadísticamente significativa entre las tres cepas empleadas; dicho efecto se mantiene en concentraciones mayores de péptido (<109,14 μM). En concentraciones menores de 13,5 μM y 27,28 μM el efecto se redujo hasta un 30 % de inhibición de la biopelícula y en concentraciones inferiores a 6,82 μM en un 25 % de inhibición; por lo que el efecto de CDAP-4 en el tratamiento simultáneo es proporcional a la concentración empleada, a mayor concentración mayor efecto inhibitorio.

Al evaluar el efecto del péptido en la prevención de la biopelícula, es decir en el pre-tratamiento de las superficies, se encontró que la cepa mayormente afectada

fue la cepa MUC (cepa mucoide) ya que a partir de 6,82 μM se obtuvo una inhibición de formación de la biopelícula en un 60 % manteniendo el efecto hasta la concentración más alta empleada de CDAP-4 (109,14 μM), mostrando una diferencia estadísticamente significativa respecto al resto de las cepas empleadas en el experimento. Para la cepa *AlgC*- y PAO1 en concentraciones inferiores a 13,64 μM el efecto fue de un 20 %. Específicamente para PAO1, el mayor efecto se observó a una concentración de 109,14 μM con un 85 % de inhibición. Por otro lado para la cepa *AlgC*- (no mucoide) la máxima inhibición alcanzada fue del 50 % a 109,14 μM , siendo esta cepa la menos afectada en la prevención de la formación de la biopelícula, a pesar de que originalmente esta cepa no producía biopelícula.

Finalmente en la evaluación del efecto del péptido sobre la biopelícula ya formada, es decir post-tratamiento, mostró que la cepa mayormente afectada fue la *AlgC*- (no mucoide), la reducción de la biopelícula fue entre un 35 % y 45 % con las concentraciones menor (3,41 μM) y mayor (109,14 μM) empleada durante el análisis respectivamente. Seguida por la cepa MUC (cepa mucoide) con un efecto mínimo de 25 % (6,82 μM) y un máximo de 42 % (109,14 μM). La cepa menos afectada fue la cepa PAO1 (capaz de ser mucoide en condiciones de estrés) solo se produjo una disminución de la biopelícula del 10 % (6,82 μM) a un máximo de 25 % (109,14 μM). La resistencia de la biopelícula ésta determinada por las características del medio y la cepa a evaluar, ya que pueden ser resistentes al efecto del péptido en mayor (PAO1) o en menor grado (*AlgC*-).

10.4 ANÁLISIS DEL MODELO ANIMAL

Una vez determinada la actividad antimicrobiana de CDAP-4 *in vitro* frente a diversas cepas de *P. aeruginosa*, se procedió a evaluar su actividad antimicrobiana *in vivo*, a través de un modelo murino de infección pulmonar crónica. Para ello se empleó la cepa de referencia *P. aeruginosa* ATCC 39324 (MUC), que permitió simular la patología de una infección por esta bacteria en vías aéreas inferiores de un paciente humano con fibrosis quística (FB) (van Heeckeren & Schlucher, 2002). Para realizar los experimentos fue necesario el encapsulamiento de la bacteria en perlas de agarosa, que posteriormente fueron inoculadas vía intratraqueal (V.I.) a ratones y monitoreados durante 21 días para evaluar el efecto de la presencia de las bacterias en el tejido pulmonar. A continuación se presentan los resultados de cada uno de los pasos del procedimiento para desarrollar la infección crónica.

10.4.1 ENCAPSULAMIENTO DE BACTERIAS

De acuerdo al modelo desarrollado por van Heeckeren y Schlucher (2002), fue necesario encapsular a las bacterias en perlas de agarosa (material inocuo) lo que les permitió su permanencia y favoreció la generación de un cuadro crónico de

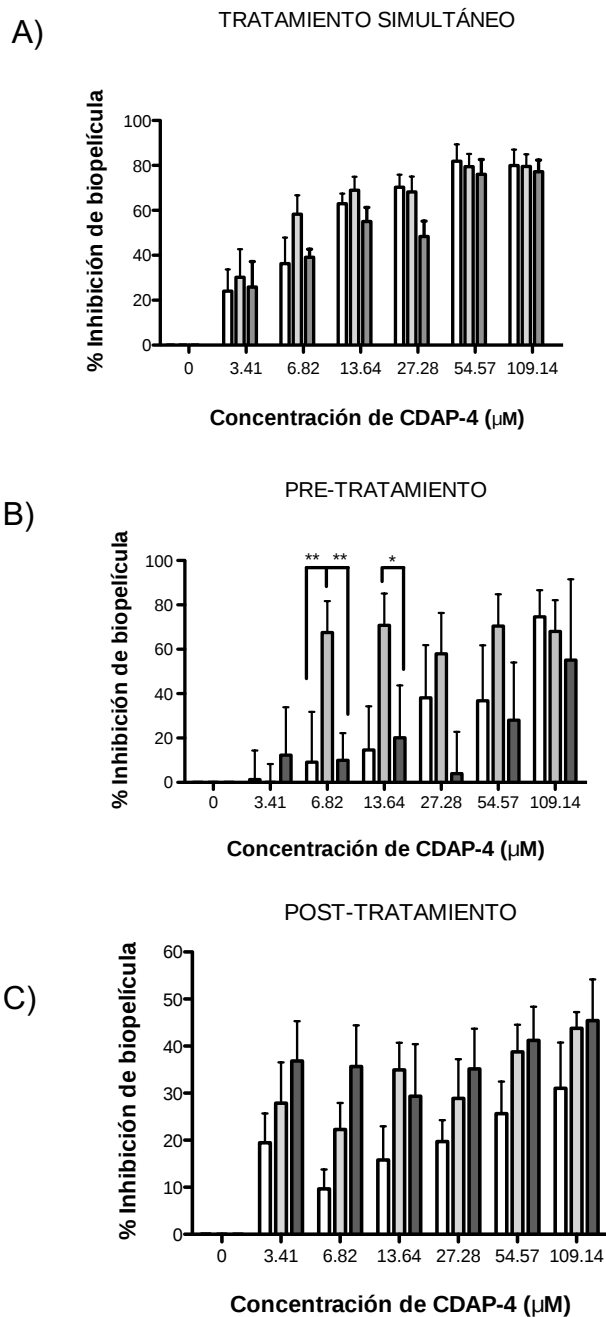


Figura 9. Actividad del péptido CDAP-4 sobre la biopelícula generada por *Pseudomonas aeruginosa*. La técnica empleada fue la del cristal violeta (CV) para el análisis del efecto sobre la biopelícula. Se emplearon tres cepas fenotípicamente diferentes PAO 1 (sensible a transformarse a mucoide), MUC (mucoide) y *AlgC*- (no mucoide). En A) efecto de CDAP-4 en la formación de la biopelícula, así como una fotografía de la placa con la tinción de CV; en B) efecto de CDAP-4 previniendo la formación de la biopelícula, se muestra su gráfica y su placa correspondiente; en C) se evaluó el efecto de CDAP-4 sobre la biopelícula ya formada, se muestra su gráfica y su placa con CV. El análisis estadístico empleado fue una prueba ANOVA bifactorial, con una $n=9$ (* $P<0,05$; ** $P<0,01$).

infección. En la figura 10 se presenta la distribución del tamaño de las perlas, se observa que el 91 % presenta un tamaño entre 10 y 30 μm , así como dos micrografías: una en contraste de fases donde se muestra que las perlas de agarosa son casi esféricas y una segunda micrografía de las bacterias encapsuadas en las perlas de agarosa teñidas con cristal violeta (CV).

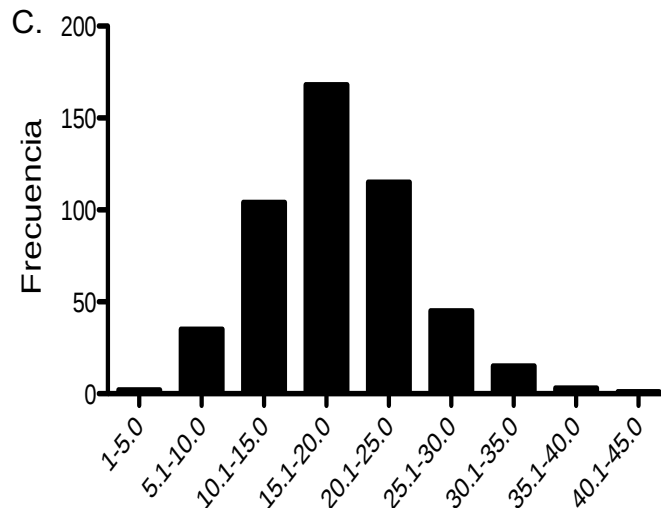


Figura 10. Tamaño y forma de las perlas de agar. A. Micrografía de campo oscuro de las perlas de agar, B. Tinción con Cristal Violeta de las perlas con *P. aeruginosa* (MUC) encapsulada, las flechas muestran bacterias encapsuladas. C. Distribución del tamaño de 500 perlas de agarosa, con base al programa ImageJ; se contaron 100 perlas para cada experimento por triplicado. Se realizó un análisis estadístico de Kolmogorov-Smirnov, los datos siguen una distribución normal.

10.4.2 MODELO CRÓNICO DE INFECCIÓN

El parámetro para determinar el establecimiento de la infección y su cronicidad, fue la presencia de unidades formadoras de colonias (UFC) viables en los pulmones de los ratones durante los 21 días que se realizó el análisis. Para la determinación de las UFC, el tejido pulmonar completo de los ratones fue homogenizado, diluido y sembrado en agar de aislamiento para *Pseudomonas* (PIA), posteriormente fueron contabilizadas las UFC, el conteo se muestra en la figura 11. Se inició con una carga bacteriana de 1×10^6 UFC/g de pulmón, el cual se incrementó a 9.5×10^7 UFC/g de pulmón en el día 3 y alcanzó un máximo de 1×10^8 UFC/g de pulmón en el día 7. Para el día 14 y 21 se presentó una disminución de la carga bacteriana en un 92% aproximadamente por debajo del inóculo inicial, al comparar los grupos entre ellos, se encontró diferencias estadísticamente significativa entre todos ellos exceptuando la comparación entre los días 14 y 21. A pesar de una disminución elevada, se obtuvo una cronicidad del modelo debido a la permanencia de la

bacteria hasta los 21 días ya que la bacteria sin estar encapsulada es eliminada totalmente entre el día 7 y 10 posterior a la infección (Hoffmann et al., 2005). Estos resultados permitieron dar seguimiento a la evaluación del modelo de infección crónica.

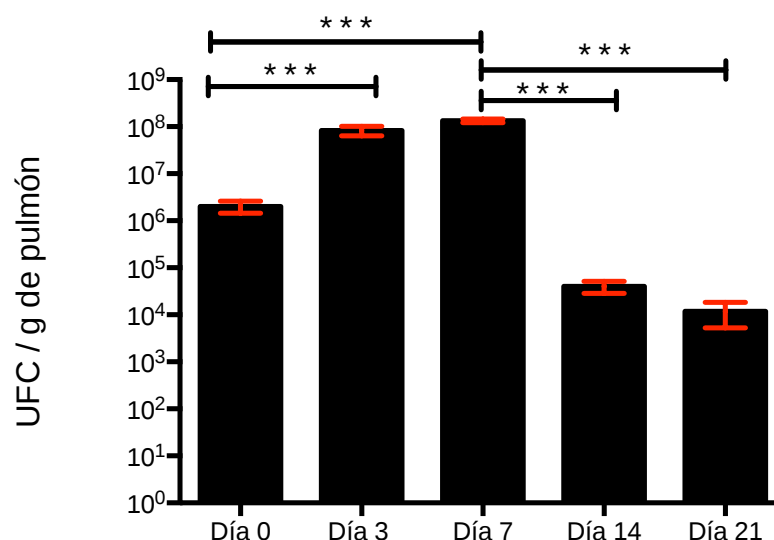


Figura 11. Cuantificación de bacterias viables de la cepa *P. aeruginosa* (MUC) en ratones C57BL/6 durante la infección crónica. El monitoreo se realizó en 5 tiempos diferentes por triplicado (n=9). Los datos fueron analizados a través de una prueba estadística de ANOVA de una vía y una prueba *post-hoc* de Tukey. Se muestran diferencias estadísticamente significativas *** $P < 0.001$.

10.5 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD *IN VIVO* DE CDAP-4 EN EL MODELO CRÓNICO DE INFECCIÓN POR *P. aeruginosa*

Sobre el modelo de infección pulmonar crónico establecido en ratones C57BL/6 se evaluó el efecto del péptido antimicrobiano CDAP-4 (256 µg) en cada uno de los tiempos predeterminados anteriormente, usando como controles del tratamiento: solución salina (SS) y el ciprofloxacino a una concentración de 0,25 µg, como control positivo debido a que es el antibiótico de elección para el tratamiento de infecciones respiratorias por *P. aeruginosa*.

En la figura 12 se comparan las concentraciones de UFC presentes en los tejidos pulmonares de los ratones tratados con: perlas de agarosa y solución salina; infectados con *P. aeruginosa* encapsulada en las perlas de agarosa y tratados con solución salina (SS); infectados con *P. aeruginosa* encapsulada y tratados con CDAP-4 (P-4); y ratones infectados con *P. aeruginosa* encapsulada y tratados con ciprofloxacino (CIPRO); en los diferentes días que duró el análisis. Para el grupo de ratones que fue inoculado con las perlas no se muestra barra en la gráfica debido a la inexistencia de UFC aisladas en los tejidos pulmonares de dicho tratamiento, siendo el control negativo de infección, además que los ratones no presentaron ningún síntoma asociado a infecciones originados por *P. aeruginosa*.

En las muestras de los homogenizados del tejido pulmonar se encontró que para los días tres y siete los tratamientos de CDAP-4 y de ciprofloxacino disminuyeron las UFC presentes en 98,9 % y 99,9 % respectivamente, estableciéndose diferencias estadísticamente significativas entre los ratones tratados y no tratados con antimicrobianos, pero no así entre los grupos tratados con el péptido, el ciprofloxacino y las perlas de agarosa en los mismos tiempos. Para el resto de los días analizados dicho efecto no fue observable, ya que la cantidad de UFC aisladas del tejido se mantuvo constante en los diferentes tratamientos con aproximadamente 1×10^5 UFC/g de pulmón sin importar si los ratones estaban infectados o si habían recibido tratamiento.

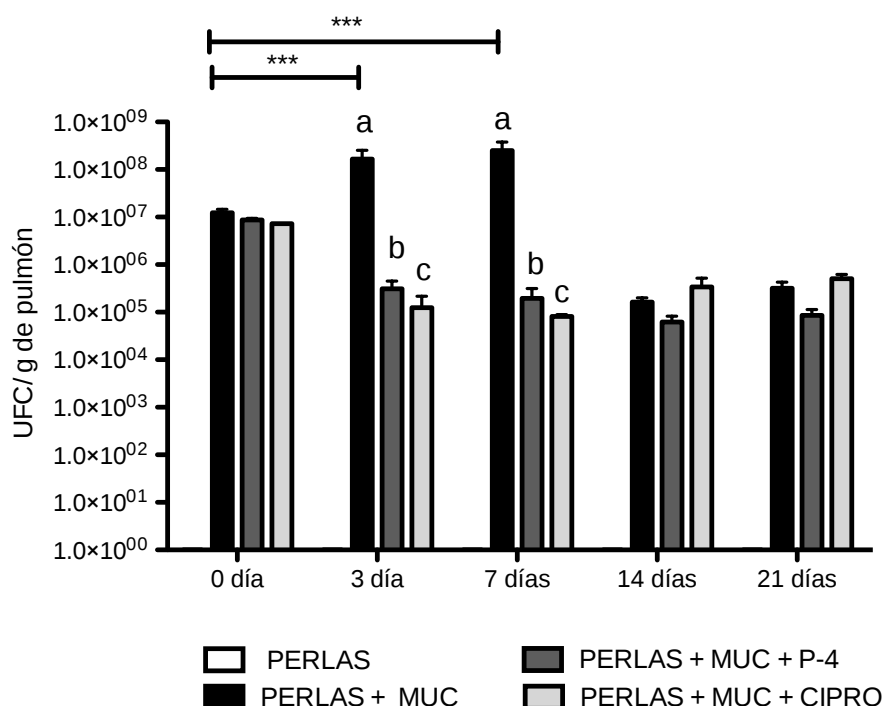


Figura 12. Efecto de CDAP-4 en las UFC del tejido pulmonar infectado con *P. aeruginosa* (MUC). Se muestra las diferentes concentraciones de UFC respecto al tratamiento empleado. El conteo se llevó a cabo en los homogenizados de tejido pulmonar tres veces por triplicado (n=9). Los resultados se analizaron mediante la prueba estadística ANOVA y una prueba *post-hoc* de Tukey. Letras diferentes refieren diferencias significativas dentro de un mismo periodo, a-b $P < 0.001$, a-c $P < 0.01$ *** $P < 0.001$.

10.5.1 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

El análisis del tejido pulmonar es de suma importancia para realizar un contraste entre el daño generado en el tejido y la presencia de bacterias, por ello se llevó a cabo el análisis histológico y morfométrico para conocer el grado de correlación entre los datos de UFC y del daño tisular ocasionado, además de generar un panorama general de la respuesta frente a la infección, tratada con solución salina y con CDAP-4. Como control positivo del tratamiento se empleo el ciprofloxacino

(los datos no se muestran), sin embargo presentó una inflamación similar al grupo tratado con perlas de agarosa. En las figuras de la 13-17 se presentan micrografías de tejido pulmonar con diferentes tratamientos en los diferentes días del procedimiento.

De manera general se puede observar que el tejido del grupo control (solución salina) presenta un infiltrado inflamatorio casi imperceptible en los tiempos analizados, ya que la solución salina no tiene efecto sobre los tejidos. Los tejidos de los ratones de los grupos administrados únicamente con perlas de agarosa, presenta un infiltrado moderado y constante, dirigido hacia las perlas mas que al tejido aledaño, se alcanzaron los picos inflamatorios en los días 3 y 7 para posteriormente disminuir en el día 14 y mantenerse al día 21, como se puede observar con la cantidad de células presentes en el tejido pulmonar.

Los tejidos de los grupos de ratones que fueron infectados con *P. aeruginosa* (MUC) encapsulada en perlas de agarosa muestra un infiltrado inflamatorio exacerbado en los bronquios y bronquiolos principalmente, afectando las áreas periféricas donde se localizan las perlas de agar con bacterias, ocasionando que las áreas fueran focalizadas; las paredes de los bronquios se muestran engrosadas y con un alto grado de infiltración, siendo mayores en el día 3, 7 y 14, para posteriormente disminuir y mantenerse en el día 21.

Finalmente los tejidos de los grupos de ratones infectados con *P. aeruginosa* y tratados con CDAP-4 mostraron una disminución importante del infiltrado inflamatorio total, comparado con los grupos únicamente infectados y no tratados, sin embargo, el engrosamiento de las paredes de los bronquiolos se mantiene para todos los grupos infectados a partir del día 7 hasta el día 21, tanto para los grupos tratados como no tratados, probablemente debido a que la infección no fue impedida si no resuelta con mayor rapidez en la presencia del péptido.

Por otro lado, el infiltrado inflamatorio y la modificación de la morfología de las estructuras del tejido pulmonar en los grupos infectados, tratados y no tratados, fueron mas evidentes en los días 3 y 7 en comparación con los otros tiempos, los procesos tan exacerbados se podrían asociar a la respuesta aguda de la infección; su disminución pero constancia en el resto de los días (14 y 21 días) denotan las modificaciones típicas de una infección crónica.

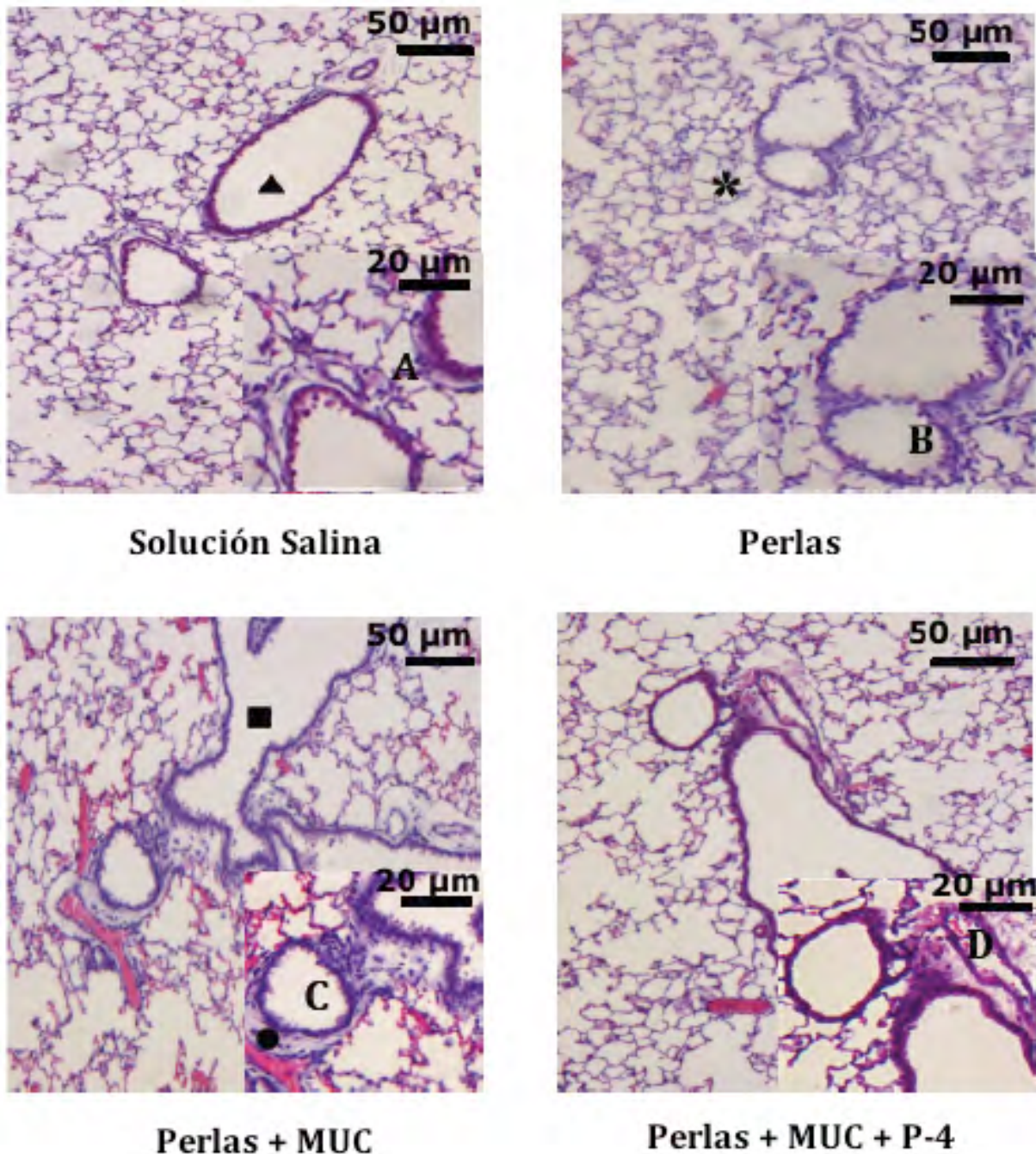


Figura 13. Histología del tejido pulmonar generado por una infección de *P. aeruginosa* (MUC) con y sin tratamiento de CDAP-4 en el día cero. Micrografías de cortes transversales del tejido pulmonar con H/E (Hematoxilina /Eosina), analizados con el microscopio Leica. En la micrografía superior izquierda se muestra el corte histológico en presencia de solución salina, resaltando un bronquiolo (▲) y una ampliación del bronquiolo (A). En la micrografía superior derecha se muestra un tejido inoculado con perlas de agar, además la estructura de los alveolos sin alterar (*) y la ampliación muestra un bronquiolo (B). En la micrografía inferior izquierda se muestra un bronquiolo terminal (■) y en la ampliación un alveolo rodeado de infiltrado peribronquial (IPB) (C) cercano a una vénula (●). En la micrografía inferior derecha se muestra un alveolo terminal a lado de un bronquio y su ampliación (D).

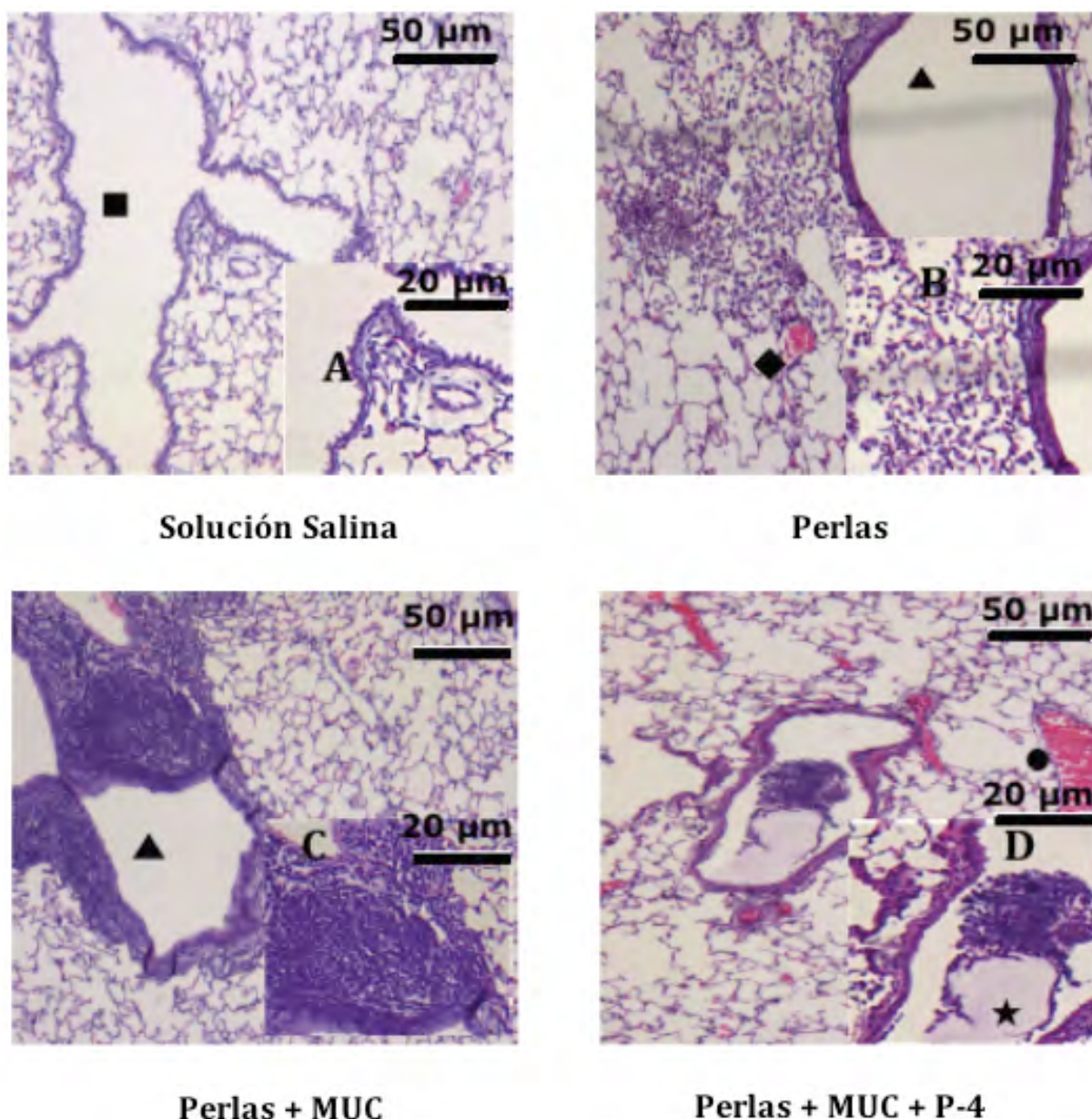


Figura 14. Histología del tejido pulmonar generado por una infección de *P. aeruginosa* (MUC) con y sin tratamiento de CDAP-4 en el día tres Micrografías de cortes transversales del tejido pulmonar con H/E (Hematoxilina /Eosina), analizados con el microscopio Leica. En la micrografía superior izquierda se muestra el corte histológico en presencia de solución salina; resaltando un bronquiolo terminal (■) y una ampliación de éste donde se muestra un área infiltrada peribronquial (IPB) (A). En la micrografía superior derecha se muestra un tejido inoculado con perlas de agar donde se identifica un bronquiolo(▲), una vénula (◆) y la ampliación muestra un área infiltrada intersticial (II) (B). En la micrografía inferior izquierda se muestra un bronquiolo (▲) y en la ampliación de infiltrado peribronquial (IPB) combinado con infiltración bronquioalveolar (IBA) (C). En la micrografía inferior derecha se muestra una vénula (●) y su ampliación muestra una perla de agar en un espacio bronquial rodeado de infiltrado celular (★), además de un leve infiltrado peribronquial (IPB) (D).

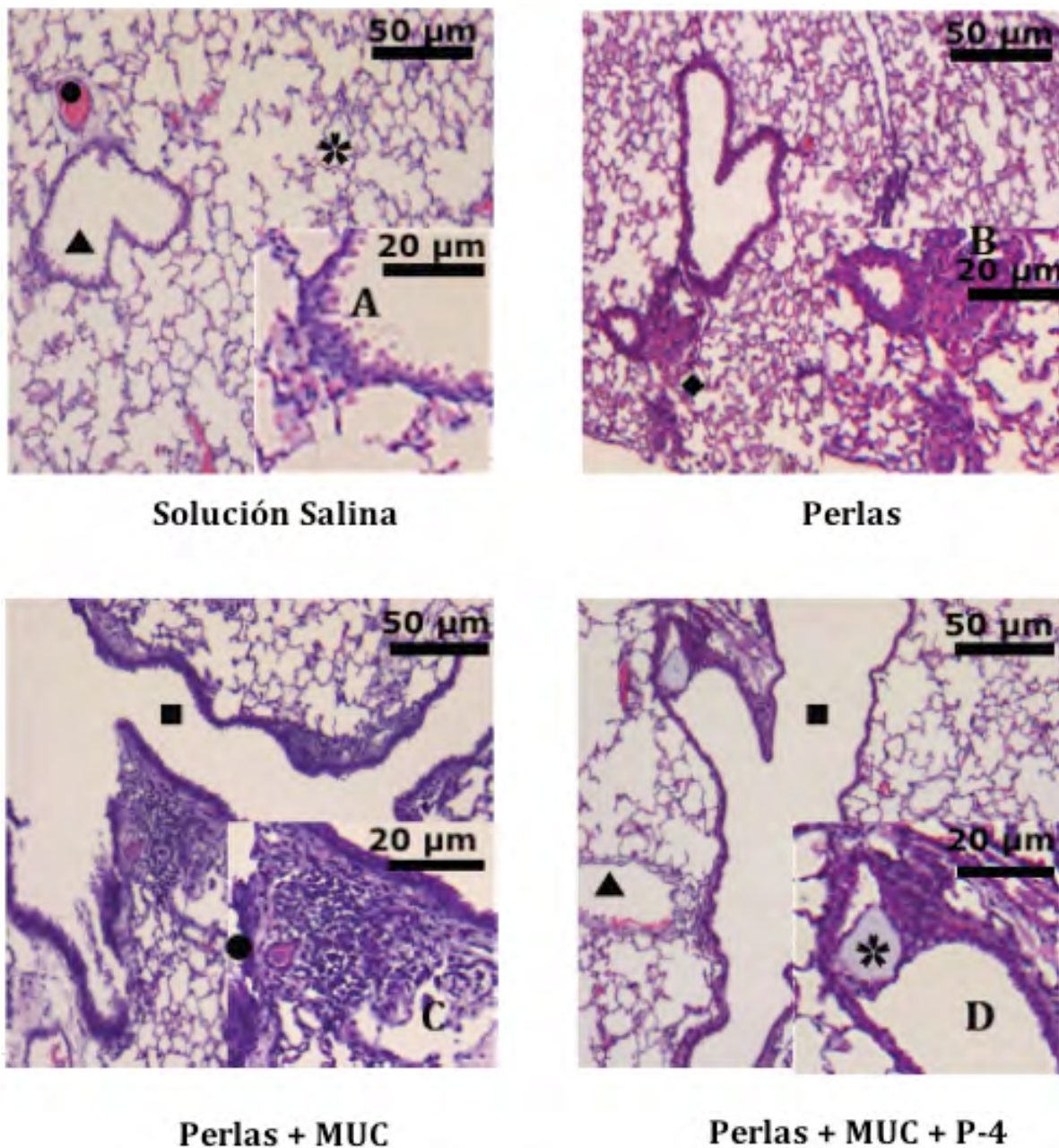


Figura 15. Histología del tejido pulmonar generado por una infección de *P. aeruginosa* (MUC) con y sin tratamiento de CDAP-4 en el día siete. Micrografías de cortes transversales del tejido pulmonar con H/E (Hematoxilina /Eosina), analizados con el microscopio Leica. En la micrografía superior izquierda se muestra el corte histológico en presencia de solución salina; resaltando un bronquiolo (▲), una vénula (●), tejido alveolar discontinuo (*) y una ampliación de infiltrado peribronquial (A). En la micrografía superior derecha se muestra un tejido inoculado con perlas de agar en presencia de infiltrado perivascular (◆) y la ampliación muestra de dicha área (B). En la micrografía inferior izquierda se muestra un bronquiolo terminal (■), una vénula (●) y en la ampliación infiltrado peribronquial (IPB), combinado con infiltrado perivascular (IPV) e infiltrado bronquioalveolar (IBA) (C). En la micrografía inferior derecha se muestra un alveolo terminal (■), un bronquiolo (▲) y la ampliación muestra una perla de agar (*) en el bronquíolo terminal, rodeada de infiltrado peribronquial (IPB) (D).

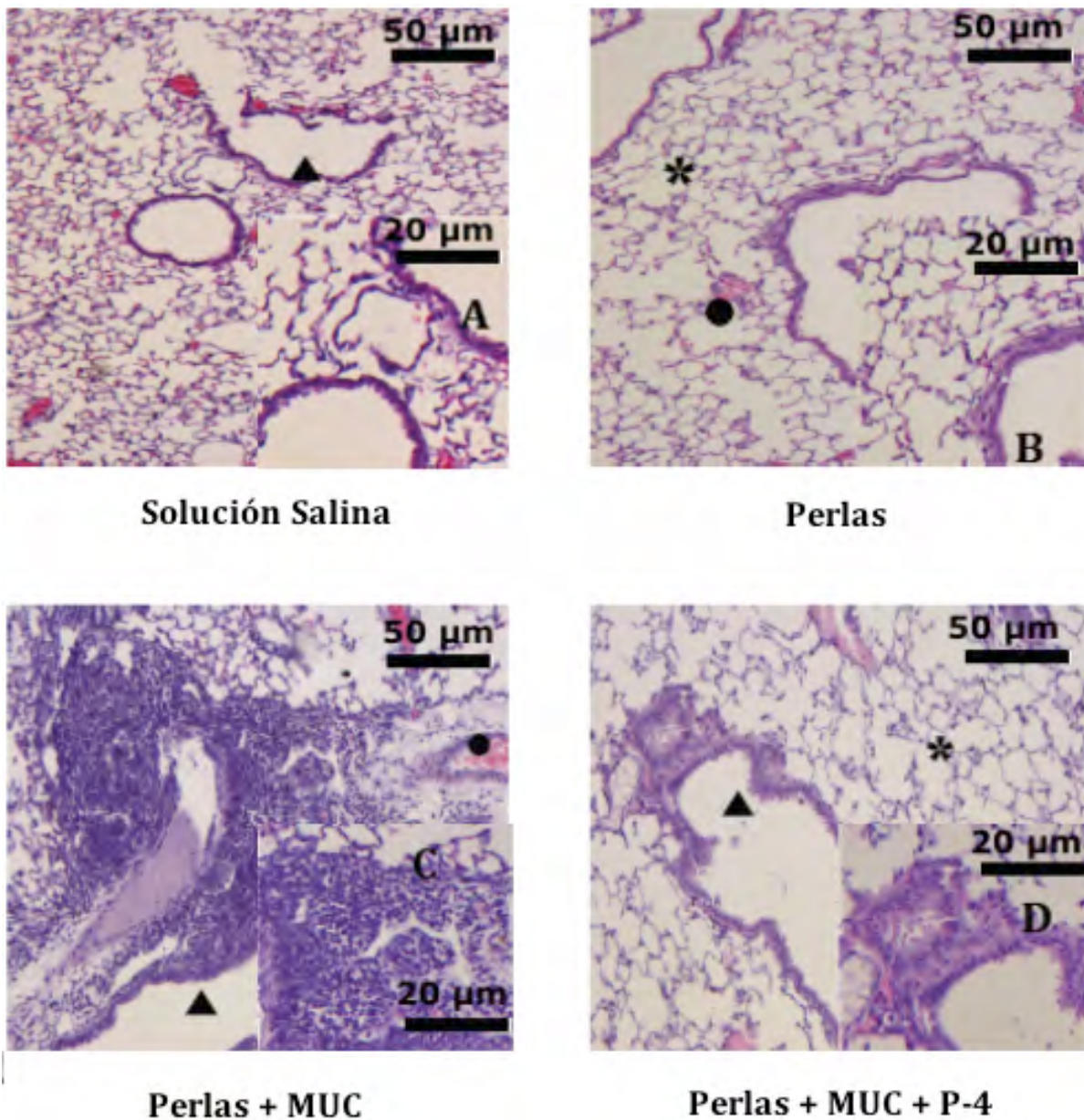


Figura 16. Histología del tejido pulmonar generado por una infección de *P. aeruginosa* (MUC) con y sin tratamiento de CDAP-4 en el día catorce. Micrografías de cortes transversales del tejido pulmonar con H/E (Hematoxilina /Eosina), analizados con el microscopio Leica. En la micrografía superior izquierda se muestra el corte histológico en presencia de solución salina; resaltando un bronquiolo (▲) y una ampliación de éste (A). En la micrografía superior derecha se muestra un tejido inoculado con perlas de agar resaltando la estructura de los alveolos sin alterar (✱), una vénula (●) y la ampliación muestra un bronquiolo con su pared ensanchada (B). En la micrografía inferior izquierda se muestra un bronquiolo terminal (▲) rodeado de infiltración peribronquial (IPB), combinada con infiltrado bronquioalveolar (IBA), una vénula (●) y en la ampliación infiltración bronquioalveolar (IBA) (C). En la micrografía inferior derecha se muestra un alveolo terminal (▲), la estructura alveolar normal (✱) y su ampliación el infiltrado peribronquial (IPB) e infiltrado perivascular (IPV)(D).

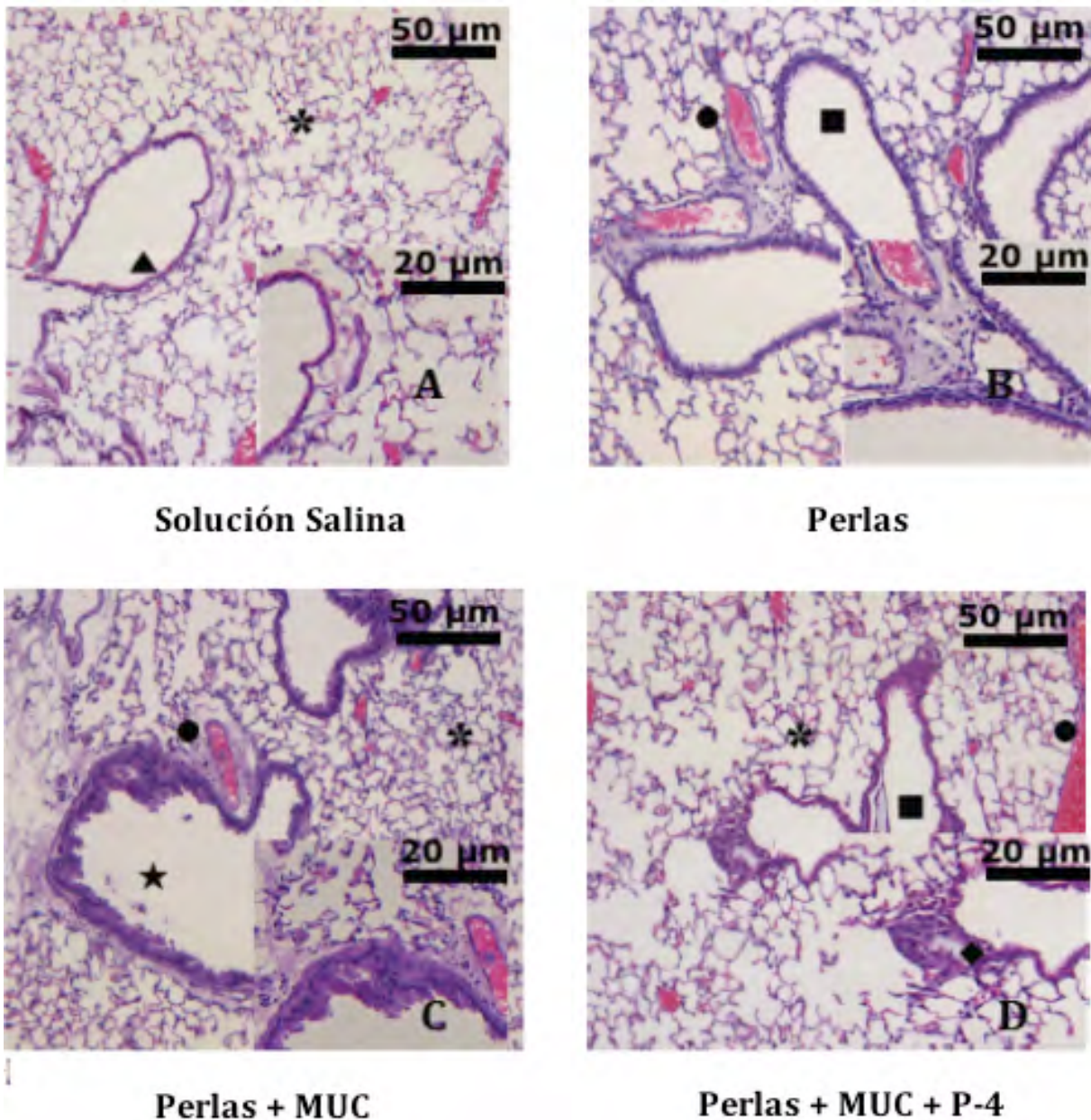


Figura 17. Histología del tejido pulmonar generado por una infección de *P. aeruginosa* (MUC) con y sin tratamiento de CDAP-4 en el día veintiuno. Micrografías de cortes transversales del tejido pulmonar con H/E (Hematoxilina /Eosina), analizados con el microscopio Leica. En la micrografía superior izquierda se muestra el corte histológico en presencia de solución salina; resaltando un bronquiolo (▲) y una ampliación de éste (A). En la micrografía superior derecha se muestra un tejido inoculado con perlas de agar resaltando un bronquiolo terminal (■) y una vénula (●); la ampliación muestra infiltrado perivascular (IPV) (B). En la micrografía inferior izquierda se muestra un bronquiolo (★), una vénula (●) y tejido alveolar normal (*); en la ampliación se muestra el engrosamiento y modificación de la pared bronquial (C). En la micrografía inferior derecha se muestra un alveolo terminal (■), una vénula (●) y tejido alveolar discontinuo (*); la ampliación muestra una perla (◆) rodeada de infiltrado celular (D).

10.5.2 CUANTIFICACIÓN DE LAS ÁREAS PNEUMÓNICAS

Para determinar de forma cuantitativa el infiltrado celular del tejido pulmonar obtenido de los diferentes grupos de animales en experimentación, a los tejidos pulmonares se les realizó un análisis morfométrico, es decir se midió el infiltrado celular, tomando como referencia el área infiltrada y el área total del tejido pulmonar y así poder definir la existencia de una diferencia entre el grupo tratado con el CDAP-4 y el grupo no tratado.

El infiltrado inflamatorio total muestra diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con CDAP-4 y el grupo tratado con solución salina para los días 7 y 14 de infección (Figura 18). Por lo tanto se llevó a cabo una cuantificación diferencial de cada tipo de infiltrado que se pudo encontrar de acuerdo a su ubicación en el tejido, de tal forma que se clasificó en: infiltrado intersticial, aquel que se encontró entre los alveolos del tejido; infiltrado bronquioalveolar aquel que se localiza entre los bronquiólos y los alveolos; infiltrado peribronquial se localiza en la periferia de los bronquiólos; y el infiltrado perivascular localizado a los alrededores de las vasos sanguíneos que irrigan al tejido pulmonar.

En el tiempo inicial del análisis (día 0), el tejido no presentó daño a la estructura general del tejido pulmonar en ninguno de los tratamientos evaluados. A partir del tercer día post-infección se muestran cambios en la morfología e infiltrado presente en los tejidos.

En el día 3 del análisis, el infiltrado peribronquial (4,4 %) es mayor en los ratones infectados y tratados con el péptido que aquellos que fueron tratados con solución salina con un 2,8 %, mostrando que la llegada de células del sistema inmunes es más eficiente en presencia del péptido, contrario a lo observado en el infiltrado bronquioalveolar el cual es mayor en ausencia del péptido (2,7 %) respecto a su presencia (1,5 %). Sin embargo al realizar una comparación del infiltrado total no hay diferencia significativa entre los grupos con los diferentes tratamientos, ya que el infiltrado intersticial y perivascular igualan las diferencias y por lo tanto no se evidenció la diferencia en el infiltrado total.

Para el día 7 de análisis, el infiltrado total es superior en los grupos infectados con *P. aeruginosa* (23 %) comparados con el infiltrado presente en el grupo infectado y tratado con el CDAP-4 (6 %). El infiltrado intersticial y bronquioalveolar es mayor en el grupo infectado y tratado con solución salina (16 % y 2,5 % respectivamente) en comparación con el grupo tratado con CDAP-4 (3 % y 0,7 % respectivamente). En cuanto al infiltrado peribronquial y perivascular no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados.

Dichos infiltrados podrían estar asociados a las áreas donde se localizan las perlas de agarosa, debido a que las perlas mas grandes no pueden atravesar el epitelio bronquial y por lo tanto favorecen el infiltrado bronquioalveolar; y las perlas más pequeñas que atraviesan y se dispersan por el tejido alveolar favorecieron el incremento del infiltrado intersticial.

Para el día 14 el infiltrado total se vio disminuido significativamente en presencia de CDAP-4, al pasar de un 21 % tratado con solución salina a un 9 % tratado con el péptido. El infiltrado intersticial y el peribronquial fueron mayores en los grupos infectados con un 8,5 % y 7 % respectivamente, contrario a los grupos tratados con CDAP-4 con 4 % y 3 % de infiltrado, respectivamente. Lo que muestra que el péptido favorece la modulación de la respuesta inflamatoria al disminuir el infiltrado ya que en su ausencia la llegada de las células inflamatorias es en mayor grado. Los infiltrados bronquioalveolar y perivascular no mostraron diferencias significativas entre los grupos tratados y no tratados con CDAP-4.

Finalmente en el día 21 el infiltrado total no mostró diferencias estadísticamente significativas, sin embargo el análisis individual muestra que el infiltrado peribronquial es mayor en el grupo infectado (4,5 %) respecto al tratado (2,5 %), mientras que el infiltrado perivascular es mayor en el grupo infectado y tratado con el péptido (4,1 %) respecto al tratado con solución salina (2,3 %). Posiblemente la presencia del péptido esta favoreciendo la llegada de las células de forma controlada, pues el infiltrado es menor alrededor de las bronquios y mayor en la periferia de los vasos sanguíneos.

Lo anteriormente expuesto se observa en la figura 18, en la que se presentan los gráficos del infiltrado inflamatorio total y sus diferentes variantes de acuerdo a su localización del tejido, de los ratones tratados y no tratados, así como, los diferentes días del análisis.

10.5.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES CÉLULARES EN EL MODELO *In vivo*

Las infecciones respiratorias generadas por *P. aeruginosa* provocan un patrón de las poblaciones de células del sistema inmune que participan en el control de la infección y que en algunas ocasiones favorecen la progresión de la infección de un cuadro agudo a uno crónico. Es por ello que se realizó el análisis de las poblaciones celulares en el infiltrado inflamatorio del tejido pulmonar en ausencia o presencia del péptido antimicrobiano CDAP-4.

Estas células se obtuvieron a través de lavados bronqueoalveolares (LBA), con un posterior análisis de citometría de flujo. Las poblaciones analizadas fueron: los neutrófilos ya que son determinantes en las infecciones agudas y favorecen la

generación de cuadros crónicos (Dubin et al., 2011); los macrófagos que también han sido descritos como determinantes en el control de la infección y su

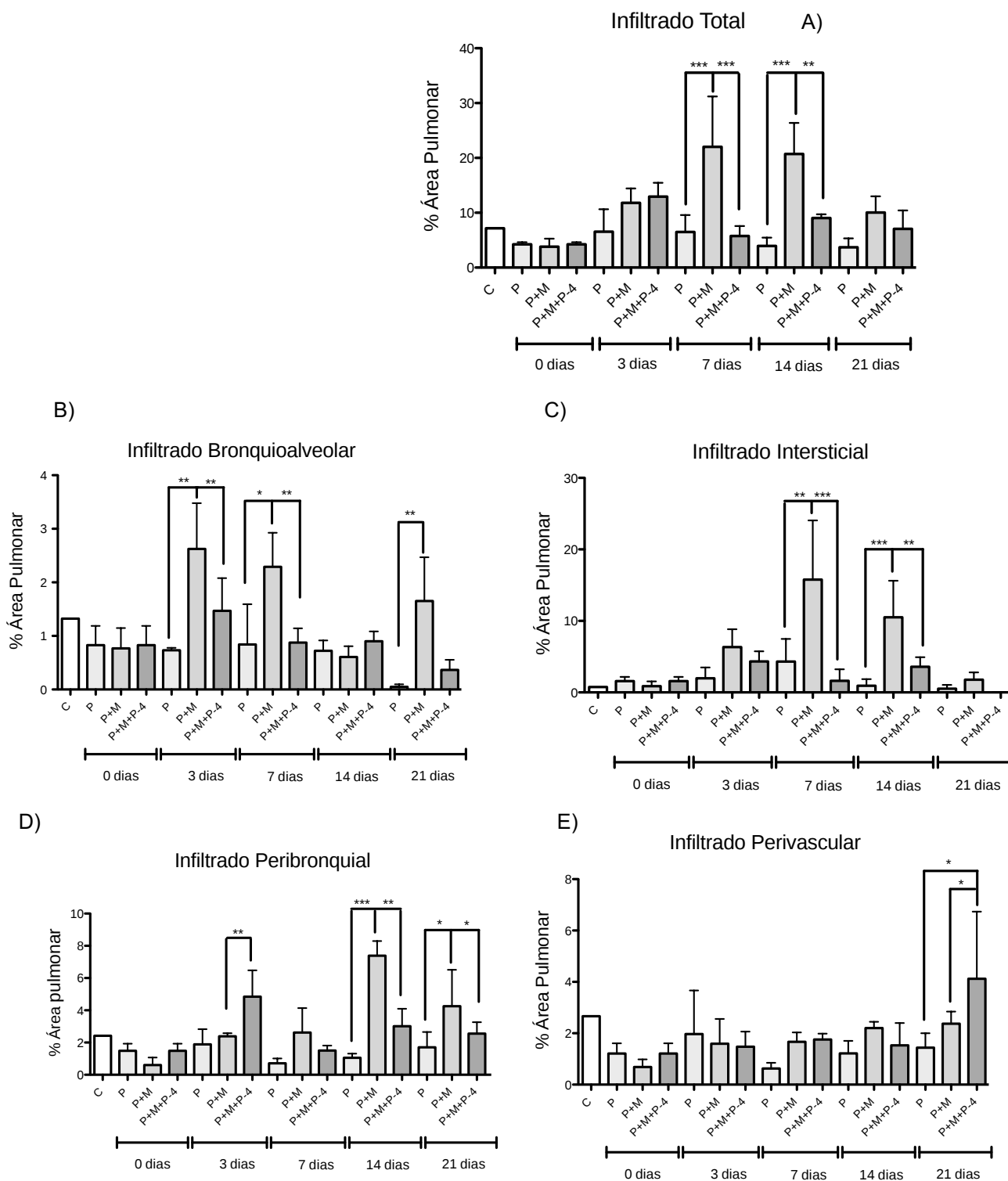


Figura 18. Análisis morfométrico del infiltrado inflamatorio de los grupos infectados con tratamiento y sin tratamiento a diferentes tiempos de infección. Las mediciones se llevaron a

cabo en cortes transversales de pulmón teñidos con H/E. Se analizaron con el procesador de imágenes LAS (Leica Application Suite) con un objetivo de 40 X. Se analizaron 3 laminillas por tratamiento. A) Infiltrado total de los tejidos B) Infiltrado Bronquioalveolar C) Infiltrado Intersticial D) Infiltrado Peribronquial E) Infiltrado perivascular. Los datos fueron analizados mediante la prueba estadística ANOVA bifactorial y prueba *post hoc* de Tukey. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$).

prolongada presencia como factor para establecer un cuadro crónico en la infección (Feola et al., 2010); y los linfocitos T citotóxicos, T colaboradores y linfocitos B, que determinan la cronicidad del modelo y del tipo de respuesta generada por el sistema inmune (Yanagihora et al., 1997).

Para realizar el análisis de las poblaciones celulares en las gráficas generadas por el citómetro de flujo, se delimitaron las poblaciones de acuerdo a la zona en la que se localizarían de acuerdo a su tamaño (FSC-H) y granularidad (SSC-H). Así para los macrófagos se delimitaron células grandes y granulosas; los granulocitos de pequeños a medianos y granulosos; y los linfocitos pequeños y no granulosos o poco granulosos, como se muestra en la figura 19, donde se presentan las poblaciones seleccionadas del LBA de acuerdo al análisis de citometría de flujo previamente descrito.

La figura 19 muestra la distribución de las poblaciones celulares de un ratón infectado con *P. aeruginosa* encapsuladas en perlas de agar y tratado con solución salina en el día siete. Se distinguen tres poblaciones diferentes de acuerdo al tamaño y a la granularidad de las células; macrófagos, grandes y granulosas (38,7 %); pequeños y pocos granulosos los linfocitos (13,9 %) y pequeños y medianos pero granulosos los granulocitos (19,2 %).

Figura 19. Representación de las poblaciones del lavado bronqueoalveolar de acuerdo al análisis de citometría de flujo (FACS). Las células analizadas fueron las presentes en los espacios alveolares, bronquiales y bronqueales, obtenidas a través de lavados bronqueoalveolares con PBS y albúmina al 20 %, posteriormente teñidas, cuantificadas y analizadas por el equipo FACS-Calibur.

De las principales células del sistema inmune que participan durante una infección son los macrófagos. Los cuales se mantienen durante todo el proceso infeccioso, a corto y largo plazo; por lo que su prolongada presencia es una característica de los cuadros crónicos. Para la búsqueda de macrófagos se empleó el marcador F4-80, el cual es específico para ellos. La figura 20 muestra las gráficas de FACS y de la cuantificación de las poblaciones que fueron seleccionadas para determinar la presencia y su variación en el tiempo, así como, los diferentes tratamientos empleados para la subpoblación F4-80 positivas.

Las variaciones de la población de células F4-80+ (macrófagos) durante el tiempo, para el grupo infectado y tratado con solución salina, confirman el establecimiento del modelo crónico, ya que su presencia varió entre un 19% a un 57%, alcanzando la mayor concentración el día 14 y una posterior disminución para el día 21 (19 %), su disminución podría hacer referencia a una resolución de la infección, como lo muestra el panel C de la figura 20.

El efecto de CDAP-4 sobre la presencia de los macrófagos, fue estadísticamente significativa en el día de mayor concentración, es decir el día 14, entre el grupo no tratado (49 %) y el tratado con CDAP-4 (7 %). Además de encontrar que el grupo control (sin ningún tratamiento) inicialmente tuvo un porcentaje elevado de macrófagos (37 %) y que las perlas inducen la presencia de estas células (57 %) en un tiempo prolongado. Por lo que la presencia de macrófagos puede estar influida por factores extras a los del modelo, sin embargo a pesar de ello, el tratamiento del péptido disminuyó la presencia de los macrófagos inclusive por debajo del control.

Por otra parte los granulocitos, principalmente los neutrófilos, son descritos como células del sistema inmune de gran relevancia en una infección ocasionada por *P. aeruginosa*, los cuales juegan un papel muy importante en la primera respuesta generada por el sistema inmune y posteriormente favoreciendo el desarrollo de un cuadro crónico de infección, al ocasionar un daño del tejido pulmonar. Para la búsqueda de los neutrófilos en los LBA se emplearon los marcadores GR1 y CD11b. En la figura 21 se presentan los gráficos de las poblaciones seleccionadas para su estudio y las comparaciones entre los diferentes tiempos y tratamientos del análisis.

La concentración de neutrófilos más elevada alcanzada durante el análisis se presentó el día 3 con un 32 % disminuyendo a un 28 % en el día 7 y para los días 14 y 21 solo se contabilizó un 3 % aproximadamente de acuerdo a lo esperado, ya que los neutrófilos se encuentran elevados en la fase aguda (primeros días) de la

infección por *P. aeruginosa* para su posterior disminución en el cuadró crónico. Por otro lado, se pudo observar que las perlas tienden a aumentar la presencia de los neutrófilos, aunque no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos control y los tratados con las perlas.

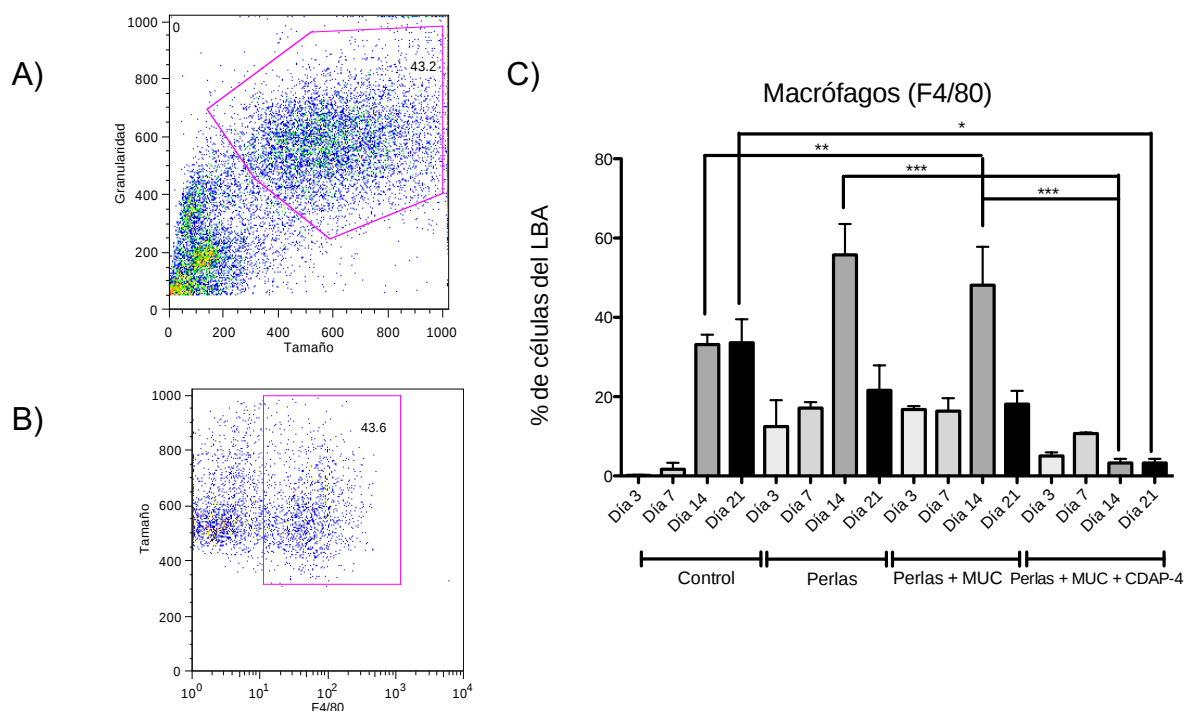


Figura 20. Análisis de las poblaciones celulares del LBA correspondientes a los macrófagos.

En A) se muestra la población total de un ratón infectado y tratado con solución salina del día 14 y encerrada la subpoblación empleada para el análisis de los macrófagos. En B) se muestra el gráfico generado a partir de la población previamente seleccionada y positiva para el marcador F4/80, la cual fue empleada para el análisis de las poblaciones en los diferentes tratamientos. En C) se muestra la gráfica comparativa del porcentaje de células F4/80+ con los diferentes tratamientos y tiempos empleados. Los resultados fueron analizados con la prueba estadística de ANOVA bifactorial y posteriormente con una prueba de Tukey (** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$; y una $n = 5$).

El tratamiento de CDAP-4 en los grupos infectados disminuyó la presencia de los neutrófilos, para el día 3 paso de un 19 % a un 9 % con el péptido, para el día 7 la misma tendencia se mantuvo al pasar de un 17 % a un 10 %, para los últimos días analizados no se encontró diferencia entre los tratamientos. El péptido favorece la disminución de los neutrófilos en el tejido, lo que permite que el cuadro no sea tan agresivo, por la respuesta desmedida y poco dirigida de los neutrófilos contra el patógeno y el daño también se ocasione al tejido circundante.

De las principales células que conforman la respuesta adaptativa y que fueron seleccionadas para su análisis durante este estudio fueron: los linfocitos T que a su vez se clasifican en linfocitos T citotóxicos (Tc) y T colaboradores (Th); y los linfocitos B. El análisis de los linfocitos T se dividió en dos: para los linfocitos Th, se

empleó el marcador CD3 y CD4; y para los linfocitos Tc el marcador CD3 y CD8; para los linfocitos B el marcador CD19.

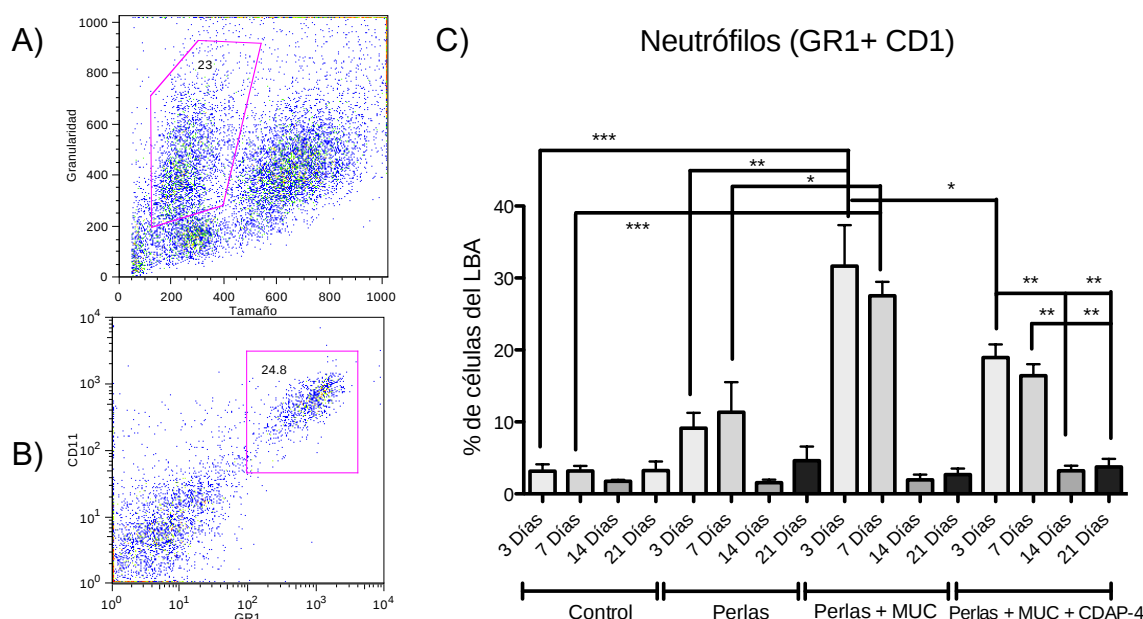


Figura 21. Análisis de las poblaciones celulares del LBA correspondientes a los neutrófilos.

En A) se muestra la población total de un ratón infectado y tratado con solución salina del día 3 y encerrada la subpoblación empleada para el análisis de los neutrófilos. En B) se muestra el gráfico generado a partir de la población previamente seleccionada y positiva para el marcador GR1 y CD11b, la cual fue empleada para el análisis de las poblaciones en los diferentes tratamientos. En C) se muestra la gráfica comparativa del porcentaje de células GR1+ y CD11b+ con los diferentes tratamientos y tiempos empleados. Los resultados fueron analizados con la prueba estadística de ANOVA bifactorial y posteriormente con una prueba de Tukey ($***P < 0.001$, $**P < 0.01$ y $*P < 0.05$; y una $n = 5$).

Durante el proceso infeccioso se encontró una tendencia al aumento de la concentración de células CD4+ a partir del día tres y manteniedose así hasta el último día de análisis, sin existir una diferencia estadísticamente significativa

Por otro lado, la presencia del péptido, favoreció la disminución de la población celular CD4+ en todos los días analizados. Dicha tendencia sugieren que el péptido al reducir la población de bacterias, indirectamente favorece la disminución de las células CD4+. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 22.

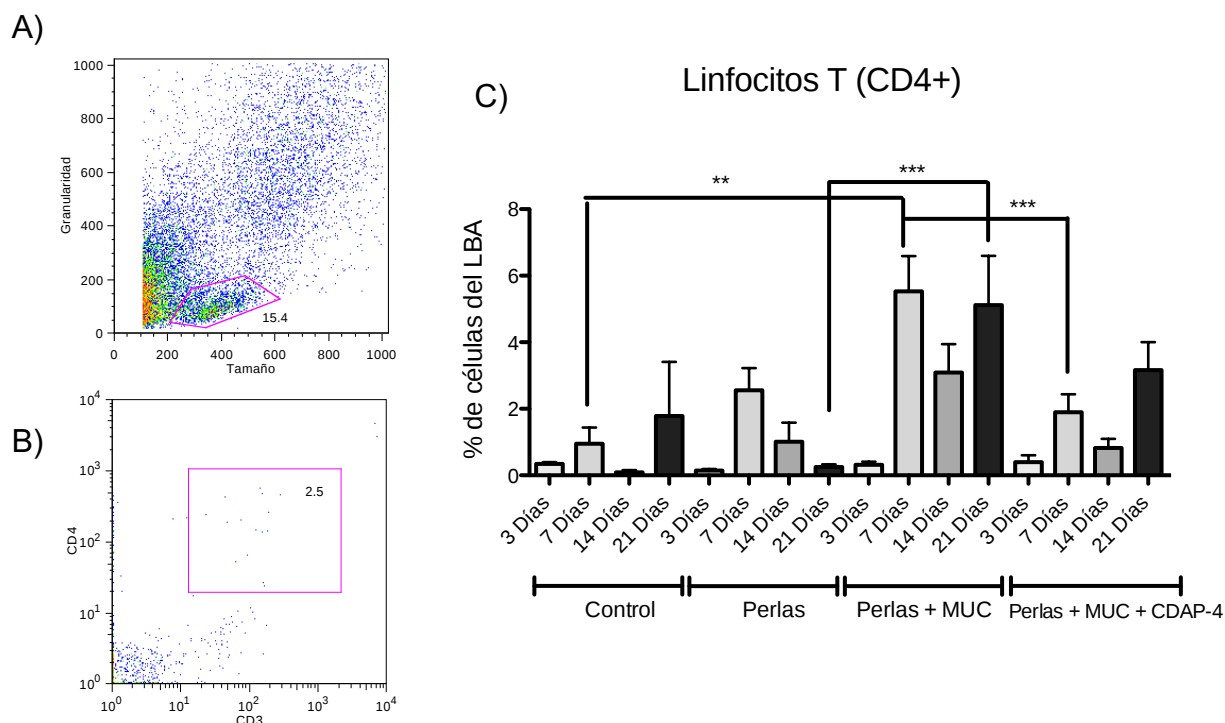


Figura 22. Análisis de las poblaciones celulares del LBA correspondientes a los linfocitos T cooperadores (Th). En A) se muestra la población total de un ratón infectado y tratado con solución salina del día 14 y encerrada la subpoblación empleada para el análisis de linfocitos Th. En B) se muestra el gráfico generado a partir de la población previamente seleccionada y positiva para el marcador CD3 y CD4, la cual fue empleada para el análisis de las poblaciones en los diferentes tratamientos. En C) se muestra la gráfica comparativa del porcentaje de células CD3+ y CD4+ con los diferentes tratamientos y tiempos empleados. Los resultados fueron analizados con la prueba estadística de ANOVA bifactorial y posteriormente con una prueba de Tukey ($***P<0.001$, $**P<0.01$ y $*P<0.05$; y una $n=5$).

En el análisis de los linfocitos Tc, de manera general existe una tendencia a incrementar su porcentaje de la en el tiempo, es decir, para el grupo inoculado con perlas que inicialmente era de 0.5% (día 3) aumentó a 0.9% (día 7), continuando con el 1.2% (día 14) y finalmente con 1.7% (día 21). El comportamiento se repite en el grupo infectado; y el infectado y tratado, aunque solo para el día 21 existió una diferencia significativa, como lo muestra la figura 23 en el panel C.

Los resultados mostraron que la respuesta adaptativa esta mayormente dirigida a la estimulación y control del ambiente inflamatorio que al control de las células infectadas, durante el proceso infeccioso.

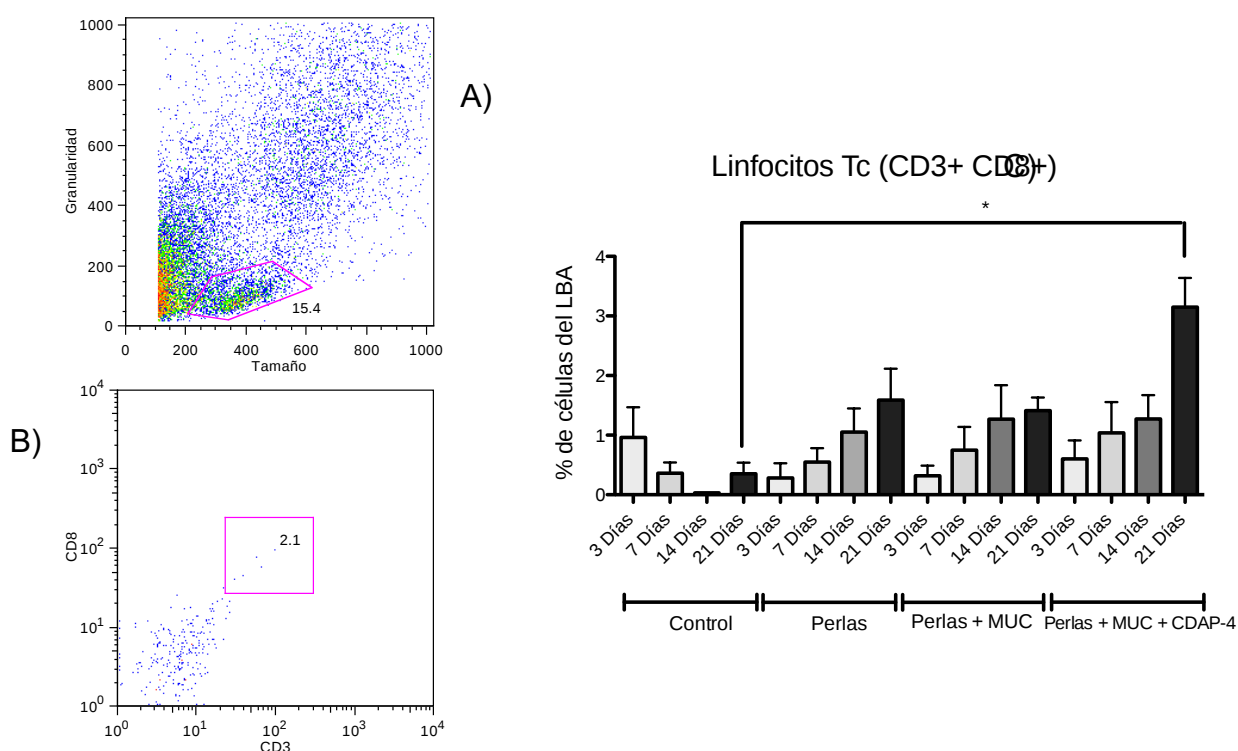


Figura 23. Análisis de las poblaciones celulares del LBA correspondientes a los linfocitos T citotóxicos (Tc). En A) se muestra la población total de un ratón infectado y tratado con CDP-4 del día 21 y encerrada la subpoblación empleada para el análisis de linfocitos Tc. En B) se muestra el gráfico generado a partir de la población previamente seleccionada y positiva para el marcador CD3 y CD8, la cual fue empleada para el análisis de las poblaciones en los diferentes tratamientos. En C) se muestra la gráfica comparativa del porcentaje de células CD3+ y CD8+ con los diferentes tratamientos y tiempos empleados. Los resultados fueron analizados con la prueba estadística de ANOVA bifactorial y posteriormente con una prueba de Tukey ($***<P0.001$, $**P<0.01$ y $*P<0.05$; y una $n=5$).

Finalmente se evaluaron los linfocitos B, con el marcador CD19, como se muestra en la figura 24. De forma general, durante el proceso infeccioso, la población celular correspondiente a los linfocitos B se vio incrementada en los días finales del análisis, es decir en los días 14 y 21.

Los linfocitos B disminuyen un 59.62 % en los grupos no tratados con el péptido respecto a los que si lo fueron para el día 14, a pesar de ser el único día con diferencia estadísticamente significativa, la tendencia a disminuir en presencia del péptido se mantiene en el día 21, al observar el grupo infectado con un 5.2 % de células CD19+ disminuye a 3.8 % en presencia del péptido.

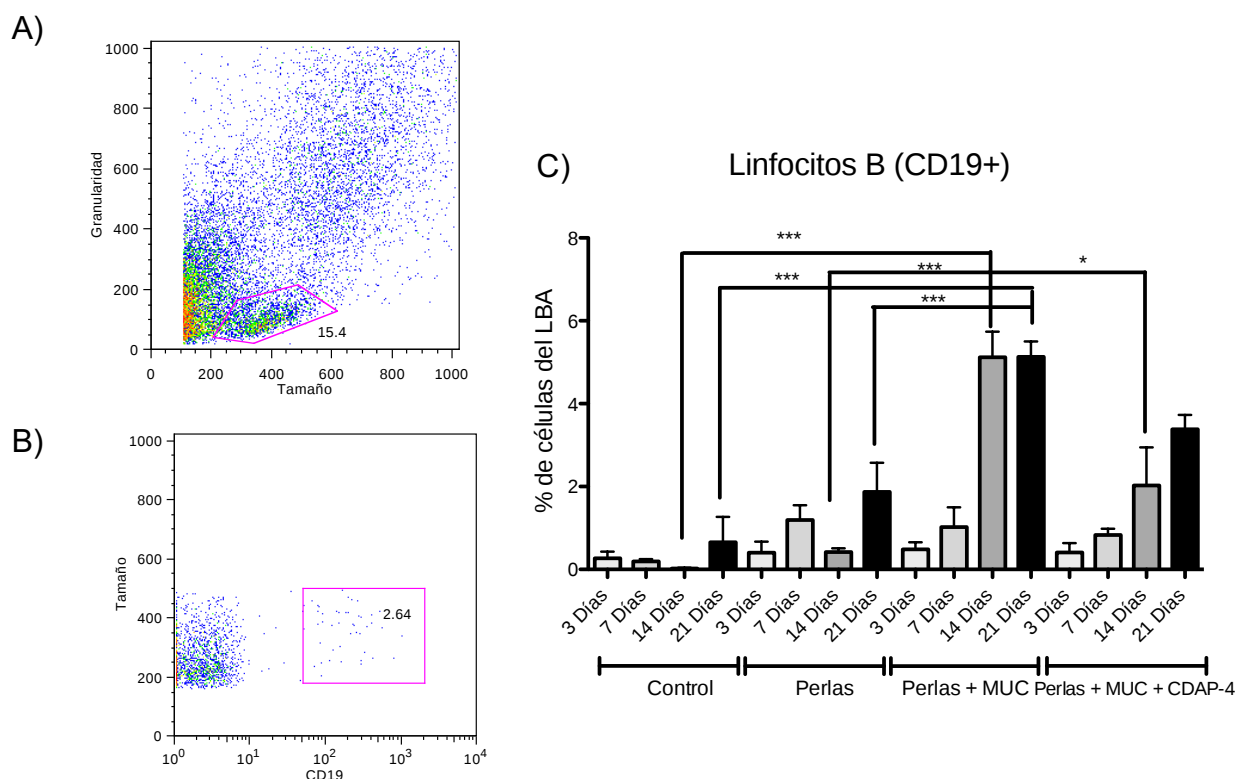


Figura 24. Análisis de las poblaciones celulares del LBA correspondientes a linfocitos B. En A) se muestra la población total de un tejido pulmonar de un ratón infectado y tratado con solución salina del día 14 y encerrada la subpoblación empleada para el análisis de linfocitos B. En B) se muestra el gráfico generado a partir de la población previamente seleccionada y positiva para el marcador CD19, la cual fue empleada para el análisis de las poblaciones en los diferentes tratamientos. En C) se muestra la gráfica comparativa del porcentaje de células CD19+ con los diferentes tratamientos y tiempos empleados. Los resultados fueron analizados con la prueba estadística de ANOVA bifactorial y posteriormente con una prueba de Tukey ($*** < P0.001$, $** < P0.01$ y $* < P0.05$; y una $n = 5$).

11. DISCUSIÓN

El presente trabajo tiene la intención de evaluar el efecto antimicrobiano del péptido derivado de la quimiocinas CCL13, conocido como CDAP-4, al cual en el año 2007 se reportó con actividad antimicrobiana *in vitro* en cepas Gram negativas (Martínez-Becerra, 2007). Por otro lado también se demostró que tiene un efecto favorecedor en la resolución y rescate de vida de ratones infectadas con *Pseudomona aeruginosa* en un cuadro agudo (Cossio, et.al., 2018).

La importancia de este patógeno reside en que es uno de los principales agentes causales de infecciones nosocomiales, principalmente en pacientes con catéter, en pacientes quemados y que padecen fibrosis quística; esto debido a que tiene una gran capacidad de adaptación al medio donde se encuentra, activando o reduciendo sus diversos factores de virulencia. Un factor de suma importancia es la generación de biopelícula, la cual tiene la función de proteger a la *P. aeruginosa* de la respuesta inmune del hospedero evadiendo los diversos mecanismos de esta, además de que sirve como una barrera física para que los antibióticos empleados no puedan ejercer su efecto contra el patógeno, propiciando la generación de cuadros crónicos de infección.

Debido a lo anterior y que la selección de las especies resistentes a la terapia farmacológica existente se ha incrementado, es de suma importancia la búsqueda de terapias alternativas, por ello evaluar la actividad antimicrobiana de CDAP-4 representa una oportunidad para ser considerado como una posible alternativa a las terapias convencionales o a la administración conjunta con antibióticos existentes, que mejore la respuesta y resolución de la infección, ocasionadas por cepas de *P. aeruginosa* generadoras de biopelícula.

Para ello se evaluó la actividad de CDAP-4 *in vitro* e *in vivo*. Debido a que las cepas que representan un mayor reto en su control son las generadoras de biopelícula y en los análisis previos no se evaluó el efecto del péptido sobre ellas específicamente, se retomaron las pruebas por excelencia en la clínica que determinan la actividad antimicrobiana de una molécula, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB), sobre cepas de referencia con el fenotipo mucoide y no mucoide, aislados clínicos con capacidad de generar biopelícula, y aislados clínicos con el fenotipo mucoide.

De acuerdo a la norma CLSI M7-A6 y a la NCCLS para poder determinar la CMI y la CMB es necesario que las bacterias se encuentren en su fase logarítmica de crecimiento ya que en esta fase la bacteria se encuentra en su mejor momento metabólico, generando los factores de virulencia que le permiten la invasividad en su posible hospedero. Debido a que cada cepa tiene requerimientos y condiciones muy particulares de crecimiento se obtuvieron sus respectivas curvas de

crecimiento para adecuar los tiempos en los que se consideraría que las cepas se encontraban en su fase logarítmica de crecimiento. Los resultados mostraron que no había diferencias estadísticamente significativas en el tiempo necesario para alcanzar la fase logarítmica del crecimiento, sin embargo, aunque es variable no es significativo, por lo que se cultivaron entre 4 y 5 horas para considerar que las cepas ya se encontraban en dicha fase. Aunque la diferencia en la concentración de bacterias es mayor en las cepas que tardan menos tiempo en alcanzar la fase logarítmica de crecimiento que las que tardan más, se eliminó esta diferencia al medir la absorbancia para unificar la concentración de bacterias y eliminar esta posible variación.

Se evaluó la CMI y la CMB en cepas de referencia (a las cuales se les conoce su fenotipo) como control y para poder tener una referencia de comparación con los aislados clínicos de los cuales sólo se conocen sus requerimientos bioquímicos para su cultivo y su resistencia a antibióticos, además de representar a los aislados clínicos de mayor frecuencia en infecciones nosocomiales. Los resultados para la CMI muestran que las cepas de referencias fueron susceptibles al péptido a partir de 32.8 μM y que la relación de su actividad está en función a si las cepas producen o no biopelícula, es decir para la cepa generadora de biopelícula (MUC) necesita una concentración mayor (104.12 μM) para eliminarla comparada con aquella que no produce biopelícula (AlgC-/32.8 μM) y se necesita una concentración media (101.7 μM) para eliminar la cepa que es capaz de producir la biopelícula debido a que cuenta con el material genético que le permita producirla, pero que necesita ser activado para su síntesis. (ver tabla 4). Una de las posibles causas por las que se observa este hecho es debido a que la biopelícula está funcionando como una barrera física que impide el contacto directo del péptido con la bacteria, lo que ocasiona que su efecto se vea disminuido como también se ha reportado para *P. aeruginosa* y los antibióticos (Shawar, et. al. 1999), además de que las condiciones de crecimiento favorecen que las cepas puedan generar la biopelícula. Sin embargo, en los valores de CMI para los aislados clínicos fueron muy variables, desde 41.1 μM hasta >109 μM , lo cual nos indica que las cepas son muy diferentes entre sí, que además de que son generadoras de biopelícula están produciendo otros factores de virulencia como la pirocianina, elastasa, proteasas, exotoxinas A, etc., que podrían modificar la actividad del péptido (Ben Haj et al, 2011). Los aislados clínicos con una CMI menor al de la cepa de referencia provienen de pacientes quemados y el aislado con una CMI similar proviene de una infección gastrointestinal, por lo que podría sugerir que el lugar donde se desarrolla la infección puede tener una influencia sobre los factores de virulencia que las cepas bacterianas generan de acuerdo al medio en el que se encuentren. (Ma, et. al., 2009). No obstante, la cantidad de aislados clínicos probados son pocos, por lo que es necesario incrementar el número de aislados provenientes de diferentes sitios

anatómicos de infección para poder llevar a cabo un estudio más amplio al respecto.

Los datos obtenidos para la CMB duplican los valores de CMI, lo cual es consistente con lo esperado, ya que la concentración de los antimicrobianos para matar a la bacteria generalmente duplican las concentraciones que sólo inhiben su crecimiento (García, 2009). De forma similar la concentración necesaria para matar a la bacteria en un 99.998% esta en función a la producción de biopelícula pues se necesita una concentración mayor para la cepa MUC ($> 109 \mu\text{M}$), que para PAO1 ($104.1 \mu\text{M}$) y AlgC- ($35.6 \mu\text{M}$).

La generación de biopelícula por las bacterias forma parte de los mecanismos de resistencia a un ambiente hostil para asegurar su supervivencia aun en dichas condiciones adversas. Esta es una de las razones por lo que su tratamiento a través de fármacos se dificulta ya que la biopelícula es una barrera de exopolisacáridos

que impiden la entrada de fármacos. Además, es uno de los factores de virulencia de *P. aeruginosa* que favorecen la evolución de las infecciones a cuadros crónicos, por lo que es importante valorar si el péptido CDAP-4 tiene un efecto sobre la biopelícula como parte de su posible mecanismo de acción.

La evaluación del efecto de CDAP-4 sobre la biopelícula generada por *P. aeruginosa* se llevó a cabo bajo tres perspectivas que nos permitieron ver si el efecto era preventivo, sobre su producción o directamente en el biofilm formado. Este análisis se realizó sobre cepas con el fenotipo mucoide (MUC), no mucoide, (AlgC-) como control, y en la cepa capaz de cambiar su fenotipo a mucoide (PAO 1).

El efecto preventivo de formación de la biopelícula consistió en recubrir la superficie de la placa donde se llevaría a cabo la formación de la biopelícula, la superficie se recubrió con diferentes concentraciones de CDAP-4, para posteriormente colocar a la bacteria en condiciones favorables que permitieran su establecimiento y posterior desarrollo de la biopelícula. Los resultados mostraron que la cepa más afectada fue MUC al reducir la biopelícula en un 60 % a partir de una concentración de $6.82 \mu\text{M}$ de péptido, lo que posiblemente se deba a una alteración en la adhesión de las bacterias a la superficie y a la formación de su agregación para formar microcolonias. La cepa AlgC- presento una reducción del 30 % a partir de una concentración de $54.57 \mu\text{M}$. Estos resultados no se esperaban ya que no debería existir efecto alguno, debido a que esta cepa en las condiciones anteriores no formaba biopelícula, sin embargo al enfrentarla a condiciones desfavorables fue capaz de generarlo, lo que posiblemente sugiere que se activará una ruta catabólica alternativa a la canónica para la formación de la biopelícula (Karatán & Watnick, 2009). Finalmente, la cepa que es capaz de cambiar su fenotipo a mucoide (PAO1) se vio afectada en un 30 % a partir de una concentración de $54.57 \mu\text{M}$. Los resultados sugieren que el efecto del péptido no sólo depende de las

concentraciones de CDAP-4 si no también de las condiciones en las que se pruebe su actividad, ya que ellas juegan un papel importante para la producción de la biopelícula y la activación de las vías metabólicas para su generación (Sutherland, 2001).

Para la evaluación del efecto sobre su producción se colocó a la par del péptido en presencia de la bacteria, dando como resultado una reducción de la biopelícula en un 80 % desde la primera concentración empleada del péptido (3.41 μ M) hasta la última (109.14 μ M) en las tres cepas. Debido a que se emplearon las mismas concentraciones que para las CMI y las CMB el efecto fue mayor al medir la generación de la biopelícula, ya que la disminución de la viabilidad de las bacterias fue inminente por la concentración de CDAP-4 empleadas, sin embargo las condiciones experimentales cambiaron, aumentó la cantidad de nutrientes y el tiempo de contacto entre la bacteria y el péptido, lo que permitió que la bacteria formase microcolonias y sintetizara los exopolisacáridos que conforman la biopelícula.

Finalmente se evaluó la actividad del péptido frente a la biopelícula ya generada, que es una de las posibles condiciones de empleo, cuando la biopelícula ya está formada en el tejido del paciente o en alguno de los dispositivos con los que cuente el paciente hospitalizado. Los resultados muestran que la cepa AlgC- fue la más afectada, entre 40 y 50 % de su biopelícula se vio reducida con respecto al grupo

control a partir de 3.41 μ M, seguida por MUC en un 35-45% a partir de una concentración de 6.82 μ M, y finalmente PAO-1 en la cual la biopelícula sólo disminuyó entre un 10 y 35% a partir de 6.82 μ M. El efecto sobre la estructura de la biopelícula es moderada

El efecto es bajo comparado con los porcentajes alcanzados en la prevención de la formación de la biopelícula, lo que nos indica que el efecto del péptido sobre la estructura no es su principal mecanismo de acción. Por lo que sería conveniente evaluar un posible efecto sinérgico con antibióticos, ya que el péptido podría actuar como facilitador para que el antibiótico alcance las moléculas blanco favoreciendo la resolución de la infección a pesar de la presencia de la biopelícula.

El efecto de CDAP-4 se presentó mayormente en la formación de la biopelícula para todas las cepas, probablemente se deba a que el péptido este inhibiendo el crecimiento de las bacterias o matando a una mayoría, pero aquellas que logran evadir el daño tienen el tiempo y condiciones suficientes para generar la biopelícula y complicar la actividad del péptido. Por otro lado la prevención de la formación de la biopelícula también se vio favorecida principalmente para la cepa MUC, lo que posiblemente se deba a que se estén impidiendo los primeros dos pasos de la formación de la biopelícula, es decir, que las bacterias se adhieran a la superficie y

se generen microcolonias para la posterior secreción de los exopolisacáridos (Dufour, et. al., 2012). El grado de afectación en la generación de la biopelícula es menor

El efecto del péptido sobre la biopelícula formada tiene el menor efecto comparado con la prevención y la formación de la biopelícula, lo que implica que el péptido tiene cierta capacidad de afectar la estructura de la biopelícula dejando expuesta a la bacteria, o que limita a la bacteria y evita que siga formando más biopelícula a pesar del ya existente. Para comprobar o descartar lo propuesto es necesario implementar experimentos donde se visualice al péptido llevando a cabo su funcionamiento o la estructura general de la biopelícula con técnicas de microscopía electrónica de barrido o confocal (Zutherland (2), 2001).

Determinada la actividad antimicrobiana *in vitro* de cepas de referencias y de los aislados clínicos se continuó con el desarrollo de un modelo murino de infección pulmonar crónico. El modelo de referencia es el empleado por van Hoffman y colaboradores (Hoffman, et.al., 2005), en el cual se propone reproducir la fisiopatología de una infección crónica en vías áreas inferiores por *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística.

Para que la infección genere un cuadro crónico, el método indica que la bacteria debe ser encapsulada, lo que le permitirle resistencia contra la respuesta temprana del sistema inmune y ofrece el tiempo necesario para establecerse. La ventaja de este método es que permite evaluar la respuesta completa del sistema inmune, aunque su gran desventaja es que a pesar de la similitud del daño ocasionado en el tejido pulmonar, no deja de condicionar a las bacterias a un ambiente generado artificialmente. Durante el análisis la bacteria se encontró doblemente protegida, tanto por su biopelícula y por la perla de agar, aumentando el reto para la actividad antimicrobiana del péptido y el sistema inmune del hospedero.

El método empleado para la generación de las perlas tiene poco control sobre el tamaño de las perlas de agar, por lo que fueron tamizadas, con una variación de tamaño del 20%, teniendo al 80% un tamaño de entre 25 y 35 μm . Esto favoreció que la respuesta del sistema inmune fuera más hacia una respuesta del tipo crónico, ya que se ha reportado que el tamaño de las perlas produce respuestas inmunes variables y dependientes vinculadas al tamaño de la perla más que a la presencia de la bacteria, a mayor tamaño se genera una respuesta del tipo crónico y a menor tamaño del tipo agudo (Christophersen, et. al., 2012).

Una vez obtenidas las perlas y encapsuladas las *P. aeruginosa* del fenotipo mucóide (MUC) la suspensión fue inoculada en ratones machos de la cepa C57BL/6 de entre 6 y 8 semanas de edad, debido a que esta es la cepa de ratones donde se establece más fácilmente la infección por *Pseudomonas sp.* y favorece el desarrollo del cuadro

crónico a través de una respuesta del tipo Th2 (Morrisette, et. al. 1995). Para determinar la diferencia entre la infección aguda y crónica se evaluaron principalmente el tiempo de permanencia de las bacterias viables en el tejido pulmonar y el tipo de poblaciones celulares del sistema inmune presentes en dicho tejido.

Para evaluar la permanencia de bacterias viables se cuantificaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes en los homogenizados del tejido pulmonar de los ratones infectados, durante 21 días. Se obtuvo que tras el inoculo inicial de 1-a 5 millones de bacterias en el día 0, hubo un incremento en el día 3 y 7 en el número de UFC contabilizadas, debido al establecimiento de la bacteria, sin embargo para el día 14 y 21 el conteo de UFCs disminuyó, a pesar de dicha disminución no se encontraron diferencias significativas entre las UFC del inóculo con las de estos días por lo que la permanencia de las bacterias viables se consiguió hasta 21 días post infección. En modelos agudos el tiempo máximo de permanencia de la bacteria como una infección es de 3 a 5 días ya que mas allá de ese tiempo el ratón se muere o se recupera de la infección, debido a que su sistema inmune es competente. (Harrison, et. al. 2006). De tal forma que se consideró que por permanecía de bacterias viables se había establecido el modelo de infección crónica.

Establecido el modelo de infección crónica en tejido pulmonar de ratones, se evaluó el efecto del péptido CDAP-4 en él. Los grupos de análisis fueron dos controles más tres tratamientos, los grupos control consistieron en ratones a los que se administró solución salina y otro con las perlas de agar vacías. Los tratamientos consistieron en administrar a ratones infectados con solución salina, ciprofloxacino y CDAP-4.

Los grupos control cumplieron la función de evaluar el efecto que la solución salina y las perlas de agar, es decir los vehículos tanto de la bacteria como de los tratamientos, ocasionaban por sí solos, ya que no dejan de ser elementos extraños para el tejido pulmonar. Por otro lado se empleo el ciprofloxacino al ser uno de los fármacos empleados como tratamiento para infecciones de *P. aeruginosa* (Espinoza-López, 2014).

Se encontró que el efecto del péptido tiene su máximo en los días 3 y 7 de infección, la reducción generada por el péptido es muy similar al obtenido con el fármaco de referencia (ciprofloxacino) no existiendo diferencias estadísticamente

significativas entre ambos tratamientos, de igual forma el numero de UFC que permanecen después de los tratamientos no tienen diferencia significativa con el inoculo inicial, probablemente debido a que las perlas resultan ser impenetrables para el péptido y el antibiótico y estos no pueden ejercer su actividad sobre las bacterias.

Para poder analizar la correlación existente entre la presencia de células bacterianas viables y el daño generadas por estas, así como el efecto de CDAP-4 sobre éste, se evaluó el proceso inflamatorio en el tejido a través de cortes histológicos de los diferentes tratamientos y tiempos analizados. Los tratamientos evaluados fueron, para el primer grupo el empleo de solución salina ya que es el vehículo en el que las perlas, las perlas con bacterias y el péptido serían administrados, ya que la presencia de un líquido externo no es propia en los pulmones. El segundo grupo consistió en inocular perlas de agar vacías con la finalidad de observar el efecto que las perlas ocasionan por si mismas, el tercer tratamiento consistió en inocular a los ratones con MUC encapsulada en las perlas de agar, la cual generaría el proceso infeccioso y tratados con solución salina y el cuarto grupo en el que se infectaron los ratones y además fueron tratados con CDAP-4.

El tiempo cero consistió en el procesamiento del tejido realizado una hora después de la inoculación con la bacteria encapsulada en las perlas de agar y administrado el tratamiento ya sea solución salina o CDAP-4. En ninguno de los cortes se observa presencia de infiltrado inflamatorio, o diferencias con la histología del grupo control de solución salina debido a que el tiempo es muy corto para que la respuesta del sistema inmune se presente, pero si nos permite conocer las condiciones iniciales de los tejidos.

El segundo tiempo evaluado fue a los tres días post infección y tratados 24 horas antes de su procesamiento. El incremento de un infiltrado inflamatorio se presentó en todos los grupos evaluados a excepción del grupo inoculado con solución salina. En el grupo inoculado con perlas de agar, los macrófagos atravesaron hacia la luz del alveolo y se localizaron en la periferia de las perlas para fagocitarlas, en el caso de las perlas que contenían a las bacterias, se observa un infiltrado mononuclear exacerbado en los septos alveolares, así como en los espacios alveolares, además que se encuentran focalizado en las periferias de los bronquiolos principalmente, comprado el infiltrado inflamatorio generado en el grupo tratado con CDAP-4 con el de solución salina se ve que es mucho menor el localizado en la luz de los alveolos y manteniendo el localizado en el espacio intersticial del bronquiolo.

En el séptimo día de análisis el infiltrado se mantiene exacerbado para el grupo infectado y tratado con solución salina, el cuál comparado con el grupo infectado y tratado con CDAP-4 es mucho mayor. Para el día 14 y 21 de análisis, el infiltrado va disminuyendo gradualmente, aparentemente se ve una resolución de la infección conforme avanza el tiempo de análisis y es normal debido a que el sistema inmune del ratón funciona y no deja de generar una respuesta contra agentes extraños, sin embargo la presencia del péptidos disminuye el infiltrado inflamatorio en todos los días analizados comparados con el grupo que no fue tratado con el péptido,

probablemente acelera la resolución de la infección.

El análisis histológico mostro diferencias en la localización de las áreas infiltradas, por lo que se cuantificó de forma general la inflamación generada por la infección y se realizó una cuantificación diferencial de acuerdo al tipo de área afectada.

Todas las áreas que presentaran infiltrado celular fueron consideradas como parte del Infiltrado Total (IT), los resultados muestran tendencia a que el IT es mayor en el grupo infectado y tratado con solución salina; sólo el incremento fue estadísticamente significativo para el día 7 y 14 de la infección respecto a los grupos infectados y tratados con CDAP-4 y aquellos que fueron inoculados con las perlas de agar vacías. Por otro lado el incremento y disminución de las áreas infiltradas muestran que la relación es directamente proporcional con la cantidad de UFC viables aisladas del tejido pulmonar de los ratones infectados. Además de observar que la eliminación de la infección es gradual conforme pasa el tiempo.

El infiltrado intersticial fue considerado como todo aquel que se localizara en áreas intersticiales del tejido pulmonar principalmente entre alveolos y bronquiolos, este se vio aumentado drásticamente en el día 7 de la infección en el grupo tratado con CDAP-4 en los días restantes disminuyó. Indicando que el día 7 fue clave para la permanencia de las células en los días siguientes en el infiltrado bronqueoalveolar y peribronqueal.

El infiltrado broncoalveolar se consideró todo aquel que se localizara en la periferia de bronquios y bronquiolos, así como el localizado en el área alveolar, este infiltrado como indicativo de la respuesta general de la inflamación, lo que se observó es que para el caso de los ratones infectados la presencia del infiltrado celular mononuclear y de polimorfos nucleares se vio en constante aumento desde el día 0 hasta el día 14 en el que disminuyó para volver aumentar en el día 21, significa que la inflamación fue constante y elevada, dicha respuesta se esperaba por las perlas y las bacterias presentes ya que representaban la fuente de esparcimiento de las bacterias. La presencia del péptido hizo que la máxima presencia de infiltrado celular se alcanzara en el tercer día para después ir disminuyendo paulatinamente en el resto de los días analizados. CDAP-4 aceleró la presencia del infiltrado permitiendo una respuesta más rápida en contra del patógeno y de la misma forma su presencia favoreció la disminución del infiltrado favoreciendo que dicho infiltrado no ocasionara mayor daño al tejido del hospedero favoreciendo la diseminación de la infección.

El comportamiento del infiltrado peribronqueal se comporta de manera complementaria del grupo infectado sin tratamiento con el grupo que fue tratado con CDAP-4. En el día 3 el infiltrado es mayor en el grupo tratado con el péptido que el grupo no tratado, para el día 7 el infiltrado sufre una gran disminución en el grupo

tratado contrario al grupo no tratado el cual incrementa de manera considerable, para el día 14 y 21 el infiltrado aumenta para el grupo tratado y disminuye para el grupo no tratado.

Estas continuas variaciones indican que el infiltrado celular en la infección tardó 7 días en dar su máxima respuesta en señal a la obstrucción generada en los bronquiolos ocasionada por las perlas de agar que contenían las bacterias, sin embargo esta respuesta fue más rápida en presencia del péptido ya que dicho incremento se presentó en el día 3 pero posteriormente disminuyó drásticamente para incrementarse en los últimos días y estabilizar dicha respuesta. Quizás la actividad del péptido hizo que las bacterias reaccionaran contra la agresión del éste secretando señales para que la llegada de las células fuera más rápida, pero una vez establecida la inflamación el péptido favoreció su disminución y control.

El infiltrado perivascular es constante durante en los tiempos 0, 3, 7 y 14 días, lo que significa que la llegada de las células mononucleares desde el torrente sanguíneo pasa a los vaso y capilares que inervan el tejido pulmonar en respuesta a las señales de lesión del tejido dañado es constante (Ross, 2005), por otro lado en el día 21 el infiltrado es mayor en el día 21 para el grupo tratado con CDAP-4 con respecto al resto de los tratamientos, lo que posiblemente nos indique que el péptido favorezca la llegada continua de células mononucleares.

Los continuos cambios en la cantidad de células mononucleares en las diferentes áreas dañadas nos orienta hacia la descripción de lo que esta ocurriendo en el transcurso de la infección, pero para tener una idea más clara es necesario identificar que tipos de células son las que se presentan por lo que su caracterización a través de la citometría de flujo nos indicarán que tipo de células son las presentes en dichos infiltrados inflamatorios.

Una vez conocido el comportamiento de la localización y afluencia del infiltrado celular en los diferentes días del análisis y la influencia de los tratamientos en ellos, se procedió a realizar la descripción de las poblaciones celulares presentes en el lavado bronqueoalveolar.

La primera población analizada fueron los macrófagos, los cuales pertenecen a la primera línea de defensa del sistema inmune contra las bacterias y que además su constante presencia en tiempos tardíos de infecciones también denotan una cronicidad en el proceso. (Kukavica, et. al. 2008). Para su búsqueda se empleó el marcador F4/80 el cuál es típico para su identificación (Misharin, et. al., 2013).

Los resultados muestran que los macrófagos estuvieron presentes durante todo el análisis experimental realizado, manteniendo una concentración aproximada del 20% y alcanzando su máxima concentración en el día 14 con un 50%, dicho

resultado confirma la cronicidad del modelo. La población celular de macrófagos disminuyó en los grupos tratados con el péptido CDAP-4 comparados con los no tratados, la mayor disminución se presentó en el día 21 al disminuir un 43% de la población, el resto de los días mostraron la tendencia a disminuir aunque no existe una diferencia estadísticamente significativa, lo que posiblemente se deba a que el péptido está modulando la respuesta inmune favoreciendo que algún otro mecanismo se active y está permitiendo el control de la infección, quizás otra población celular como las células dendríticas sean las responsables pues también tienen la actividad fagocítica y se ha reportado su participación en infecciones producidas por *Pseudomonas aeruginosa* (Kikuchi, et. al., 2001).

Otra de las poblaciones analizadas fueron los neutrófilos, los cuales tienen una importante función en el control de la infección eliminando a la *P. aeruginosa*, además de favorecer la progresión de cuadros agudos a crónicos cuando su presencia es prolongada debido al daño ocasionado al tejido pulmonar. Por otro lado éste patógeno ha sido capaz de aprovechar su capacidad de adaptación para evadir la batería enzimática generada por los neutrófilos con la formación de la biopelícula y así evitar el daño, por lo que este último se producirá en el hospedero y favorecerá una infección crónica (Dubin, et. al., 2012).

Esta población prolonga su permanencia en el tejido pulmonar, alcanzando su máximo entre los días 3 y 7 en el grupo no tratado, sin embargo el efecto de la administración de CDAP-4 favoreció la disminución de la población en dichos días lo que permite que el proceso inflamatorio no se prolongue y evite el daño a las células epiteliales impidiendo que se sigan generando señales inflamatorias que continúen con la llegada de células que en lugar de controlar la infección favorezcan un cuadro crónico.

Los linfocitos son células del sistema inmune que muestran la cronicidad de la infección por lo que se buscaron dentro de los LBA. Se analizaron los linfocitos T citotóxicos (Tc) y colaboradores (Th), y los linfocitos B.

En el caso de los linfocitos T colaboradores (Th) se emplearon como marcadores CD3 y CD4. Los resultados muestran que esta población comenzó a incrementarse a partir del séptimo día de infección y alcanzando dos máximos de concentración el día 7 y el 14, probablemente debido a un control de reclutamiento, sin embargo la presencia del péptido hizo que disminuyeran entre un 30% y 50%. La presencia de los CD4+ favorece el reclutamiento de los neutrófilos y su disminución también disminuye el continuo reclutamiento a los tejidos pulmonares, modulando la respuesta de las células del sistema inmune como lo demostró Liu y colaboradores al bloquear a las CD4+, el reclutamiento de los neutrófilos disminuyó en los primeros inicios de la infección generando cuadros agudos mas agresivos (Liu et.al., 2011)

Para identificar a los linfocitos T citotóxicos (Tc) se emplearon como marcadores a CD3 y CD8, las células positivas para estos marcadores muestran que su concentración aumenta conforme pasa el tiempo, y el tratamiento con CDAP4 favoreció aun más el incremento alcanzando el pico de concentración el día 21 en presencia del péptido. Dicho resultado muestra que a pesar de la disminución de la carga bacteriana encontrada para este tiempo es suficiente para que las células epiteliales sigan generando receptores para los CD8+ y por lo tanto su llegada hable de un control de las células que han sido infectadas por *P. aeruginosa* y reducen la proliferación de las bacterias, como anteriormente lo a reportado Burches y colaboradores (Burches, 2006).

Los linfocitos B también fueron contabilizados, para ello se emplearon los marcadores CD3 y CD19, los resultados muestran que esta población celular aumenta con forme aumenta el tiempo alcanzando el máximo para el día 14 ya manteniéndose hasta el día 21, sin embargo la presencia de CDAP-4 favoreció la disminución de dicha población resultado contrario a lo esperado, dicha disminución quizás se deba como efecto secundario a la disminución de alguna citocina o quimiocina generada por las células disminuidas, por ejemplo la disminución de IL-10 disminuye el reclutamiento de los linfocitos B, como quedo expuesto en una infección parasitaria en e 2012 (Fairfax et.al. 2012)

En general el efecto de CDAP-4 sobre las poblaciones celulares es disminuirlas, lo cual aparentemente beneficia al hospedero al mostrar que en el día 21 tanto histológicamente como en el conteo de UFC la infección parece encontrarse en una etapa resolutive. Al reducir las poblaciones celulares en etapas iniciales de la infección, CDAP-4 le permite al sistema inmune del hospedero plantear una respuesta más controlada, eficaz y permanente sobre el antígeno y evitar esa exacerbación que *Pseudomonas aeruginosa* emplea como mecanismo de invasividad permitiéndole generar cuadros crónicos infecciosos.

En conjunto, todos los resultados muestran a CDAP-4 como una molécula con altas probabilidades de tener una aplicación clínica en el control de infecciones crónicas generada por *Pseudomonas aeruginosa*, aunque es de suma importancia evaluar la actividad de CDAP-4 en diferentes modelos de infecciones crónicas, ya sea en ratones con deficiencias en proteínas, modelos con catéter y/o modelos de quemaduras, esto permitiría evaluar el efecto del péptido en condiciones muy diversas, con cepas bacterianas con múltiples factores de virulencia activos. Con estos nuevos análisis podrían buscarse modificaciones a la estructura del péptido con el fin de volverlo más eficaz y menos sensible a la variación de las condiciones ambientales.

12. CONCLUSIONES

El péptido CDAP-4, tiene actividad antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de fenotipo mucoide . La cepa de referencia tiene una CMI de 104.12 μ M y una CMB de >109 μ M; y para los aislados clínicos la CMI vario entre 31.9 μ M a >109 μ M y una CMB entre 65.7 μ M a >109 μ M

La actividad antimicrobiana es mayor para la cepa no mucoide con una MIC de 32.8 μ M y una CMB de 35.8 μ M. La cepa susceptible a cambiar de fenotipo presento una CMI de 101.7 μ M y una CMB de 104.1 μ M.

El péptido CDAP-4 previene principalmente la formación de la biopelícula en la cepa MUC inhibiéndola en un 70% con una concentración de 6.82 y en menor grado afecta su generación (60%) y su estructura (38%), con la misma concentración de péptido.

Se estableció al modelo crónico de infección pulmonar encapsulando a *P. aeruginosa* en perlas de agar, al día 21 fue posible cuantificar 3.5X10⁴ UFC/g de tejido pulmonar.

CDAP-4 fue capaz de reducir las UFC presentes en el tejido pulmonar en el día 3 y 7 en un 99.5%, días con mayor presencia de UFC/g de tejido pulmonar

El infiltrado inflamatorio total generado durante el proceso infeccioso disminuyó en un 50% aproximadamente en el día 7 y 14 de acuerdo al análisis histopatológico y morfométrico.

Las poblaciones celulares correspondientes a los macrófagos disminuyeron en un 43% en el día 14 con una dosis de 250 μ M de CDAP-4.

Los neutrófilos presentaron un pico de concentración el día 3 con un 30% aproximadamente de la población total, el cual disminuyo con el tratamiento de CDAP-4 en un 33.3%.

Los Linfocitos CD4+ se vieron disminuidos en un 2.4% el día de mayor presencia , es decir el día 7; los CD8+ aumentaron paulatinamente conforme al tiempo avanzó, alcanzando un máximo el día 21 con un 3% y finalmente los linfocitos CD19 disminuyeron en 3.3% el día 14; con una dosis 250 μ M de CDAP-4.

13. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

Abba, K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. (2009): Cellular and Molecular Immunology, E.U., 6a Ed., Saunders, p. 566.

Andrews, J.F. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. En: J. Antimicrob. Chemother. 48 (suppl. 1): 5-16

Arancibia, F., Bauer, T.T.; Ewig, S.; Mensa, J.; Gonzalez, J.; Niederman, M.S. & Torres A. (2002): Community-acquired Pneumonia Due to Gram-negative Bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*: Incidence, Risk, and Prognosis. En: Arch Intern Med. 162(16):p.1849-1858.

Bardoel, B.W., Vand der Ent, S.; Pel, M.J.; Tommassen, J.; Pieterse, C.M.; Van Kessel, K.P. & Van Strijp, J.A. (2011): *Pseudomonas* Evades Immune Recognition of Flagellin in Both Mammals and Plants. En: PloS Pathog 7:p.e1002206

Basset, C., Holton, J.; O'Mahony, R. & Roitt, I. (2003): Innate Immunity and Pathogen-Host Interaction. En: Vaccine Elsevier. 21: p. S2/12-S2/23.

Beisswenger C & Bals R. (2005). Functions of antimicrobial peptides in Host Defense and Immunity. En: Curr Protein Pept Sci. 6(3): p- 255-264

Bergey, D.H. & Holt, J.G. (2000): Bergey's manual of determinative bacteriology. U.S., 9a Ed., Vol.1., Lippincott Williams and Wilkins. p. 210.

Blohmke, C.J., Mayer, M.L.; Tang, A.C.; Hirschfeld, A.F.; Fjell, C.D.; Sze, M.A.; Falsafi, R.; Wang, S.; Hsu, K.; Chilvers, M.A.; Hogg, J.C.; Hancock, R.E. & Turvey, S.E. (2012): Atypical Activation of the Unfolded Protein Response in Cystic Fibrosis Airway Cells Contributes to p38 MAP-K-mediated Innate Immune Responses. En: J Immunol. 189(11): p. 5457-5475

Blum A.S., Wearsch P.A. & Cresswell P. (2013). Pathways of Antigen Processing. En: Ann Rev Immun. 31:p 443-473

Bjouürstad, Å., Fu, H.; Karlsson, A.; Dahlgren, C. & Bylund, J. (2005): Interleukin-8-Derived Peptide Has Antibacterial Activity. En: Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 49(9): p. 3889-3895.

Borchers, M.T., Harris N.L.; Wesselkamper, S.C.; Zhang, S.; Chen, Y.; Young L. & Lau G.W. (2006): The NKG2D-activating Receptor Mediates Pulmonary Clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. En: Infect Immun. 74(5): p. 2578-2586.

Bourbigot, S., Fardy, L.; Waring, J.A.; Yeaman M.R. & Booth, V. (2009): Structure of Chemokine- Derived Antimicrobial Peptide Interleukin-8R and Interaction with Detergent Micelles and Oriented Lipid Bilayers. En: Biochemistry. 48(1): p. 10509-10521

Bradshaw J. (2003): Cationic Antimicrobial Peptides: Issues for Potential Clinical Use. En: Bio Drugs. 17(4): p. 233-240

Brogden, K.A., Ackermann, M.; McCray, P.B. & Tack, F.B. (2003): Antimicrobial Peptides in Animals and Their Role in Host Defense. En: Int J Antimicrob Agents. 22(5): p. 465-478.

Chertov, O., Michiel, D.F.; Xu, L.; Wang, J.M.; Tani, K.; Murphy, W.J.; Longo, D.L.; Taub, D.D.; Oppenheim, J.J. (1996). Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell Chemoattractant Proteins Released from Interleukin-8-Stimulated Neutrophils. En: J. Biol. Chem. 271: p. 2935–2940.

Christophersen, L.J., Trostrup, H.; Mallin, D.S.; Bjarnsholt T.; Thomsen K.; Jensen P.O.; Hougen H.P.; Hoiby N. & Moser C. (2012): Bed-size Direct Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* Results in Distinct Inflammatory Response in a Mouse Model of Chronic Lung Infection. En: Clin Exp Immunol. (2): p. 222-230.

Craig, I., Pique, M.E. & Tainer J.A. (2004): Type 4 Pilus Structure and Bacterial. En: Nat Rev Microbiol. 2(5): p. 363-378.

Cole, A.M., Ganz, T.; Liese, A.M.; Burdick, M.D.; Liu, L. & Strieter, R.M. (2001): Cutting Edge: IFNInducible ELR-CXC Chemokines Display Defensin-like Antimicrobial Activity. En: J Immunol. 167(2): p. 623-627.

Conese, M., Copreni, E.; Di Gloia, S.; De Rinaldis, P. & Fumarulo R. (2003): Neutrophil Recruitment and Airway Epitelial Cell Involvement in Chronic Cystic Fibrosis Lung Disease. En: J Cyst Fibros. 2(3): p. 129-135.

Cossio-Ayala M., Dominguez, M., Méndez Enríquez, E.H. & García-Hernández. (2017). In vitro and in vivo antimicrobial activity of a synthetic peptide derived from the C-terminal region of a human chemokine CCL13 against *Pseudomonas aeruginosa*. En: J. Peptides. 94(2017): p. 49-55.

Crawford, M.A., Zhu, Y.; Green, C.S.; Burdick, M.D.; Sanz, P.; Alem, F.; O'Brien, A.D.; Mehrad, B.; Strieter, R.M.; Hughes, M.A. (2009). Antimicrobial Effects of Interferon-Inducible CXC Chemokines Against *Bacillus anthracis* Spores and Bacilli. En: *Infect. Immun.* 77: p.1664–1678.

Crawford, M.A., Burdick, M.D.; Glomski, I.J.; Boyer, A.E.; Barr, J.R.; Mehrad, B.; Strieter, R.M.; Hughes, M.A. (2010). Interferon-inducible CXC Chemokines Directly Contribute to host Defense Against Inhalational Anthrax in a Murine Model of infection. En: *PLoS Pathog.* 6: p.1-12

Delves, P.J. & Roitt, M.I. (2000): The immune System. En: *N Engl J Med.* 343(2): p. 108-117.

Denning, G.M., Wollenweber, L.A.; Railsback, M.A.; Cox, C.D.; Stoll, L.L. & Britigan B.E. (1998): *Pseudomonas* Pyocyanin Increases Interleukin-8 Expression by Human Airway Epithelial Cells. En: *Infect Immun.* 66: p. 5777-5784.

Dubin, P.J., Martz, A.; Eisenstatt, J.R.; Fox, M.D.; Logar, A. & Kolls, JK. (2012): Interleukin-23-mediated Inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* Pulmonary Infection. En: *Infect Immun.* 80(1): p. 398-409.

Dufour, D., Leung, V. & Lévesque, C.M. (2010): Bacterial Biofilm: Structure, Function and Antimicrobial Resistance. En: *J Endodo.* 22(1): p. 2-1

Dürr, M. & Peschel, A. (2002): Chemokines Meet Defensins: the Merging Concepts of Chemoattractants and Antimicrobial Peptides in Host Defense. En: *Infection and Immunity.* 70(12): p. 6515-6517.

Erfe, M.C.B., David, C.V.; Huang, C.; Lu, V.; Maretti-Mira, A.C.; Haskell, J.; Bruhn, K.W.; Yeaman, M.R.; Craft, N. (2012). Efficacy of Synthetic Peptides RP-1 and AA-RP-1 against *Leishmania* species in vitro and in vivo. En: *Antimicrob. Agents Chemother.* 56: p. 658–665.

Espinoza-López, C. (2014): Panorama de las Neumonías Nosocomiales Registradas en la Red Hospitalaria de Vigilancia. En: *Boletín Epidemiológico SSA* 2(31).

Esche, C., Stellato, C. & Beck, L.A. (2005): Chemokines: Key Players in Innate and Adaptive Immunity. En: *J Invest Dermatol.* 125(4): p. 615-628.

Fairfax, K.C., Amiel, E.; King, I.L.; Freitas, T.C.; Mohrs, M & Pearce E.J. (2012): IL-10R Blockade during Chronic Schistosomiasis *Mansoni* Results in the Loss of B Cells from the Liver and the Development of Severe Pulmonary Disease. En: *PloS*

Pathog. 8(1):e1002490.

Feola, D.J., Garvy, B.A.; Cory, T.J.; Birket, S.E.; Hoy, H.; Hayes, D.J. & Murphy, B.S. (2010): Azithromycin Alters Macrophage Phenotype and Pulmonary Compartmentalization During Lung Infection with *Pseudomonas*. En: Antimicrob Agents Chemother. 54(6): p. 2437-2447.

Fleiszig, S.M. & Evans, D.J. (2002): The Pathogenesis of Bacterial Keratitis: Studies with *Pseudomonas aeruginosa*. En: Clin Exp Optom. 85(5): p. 271-278.

Franklin, M.J., Nivens, D.E.; Weadge, J.T. & Lynne-Howell (2011): Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel and Psl. En: Front Microbiol. 2: p. 167.

Friedman, I & Kolter, R. (2004): Genes Involved in Matrix Formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 Biofilms. En: Mol Microbiol. 51(3): p. 675-690.

Ganz, T. (2003): Defensins: Antimicrobial Peptides of Innate Immunity. En: Nat Rev Immunol. 3(1): p. 710-720

García, F. (2009): Pruebas de Susceptibilidad a Agentes Antimicrobianos. Disponible en: <http://www.netropica.org/bacteriologia/Fundamentos.pdf>.

Gellatly, A.L. & Hancock R.E.W. (2013): *Pseudomonas aeruginosa*; New Insights into Pathogenesis and Host Defense. En: Pathog Dis. 67(3): p. 159-173.

Ghafoor, A., Hay, I.D. & Rehm, B.H.A. (2011): Role of Exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Architecture. En: Appl Environ Microbiol. 77(15): p. 5238-5246.

Griffith, J.W., Sokol, C.I. & Luste, A.D. (2014): Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. En: Annu Rev Immunol. 32:p. 659-702.

Guilhelmelli, F., Vilela, N.; Albuquerque, P.; Derengowski, L.S.; Silva-Pereira, J. & Kyaw, C.M. (2013): Antibiotic Development Challenges: the Various Mechanisms of Action of Antimicrobial Peptides and Bacterial Resistance. En: Front Microbiol. 4: p.353.

Hancock, R.E.W. (2001): Cationic Peptides: Effectors in Innate Immunity and Novel Antimicrobials. En: Lancet Infect Dis. 1(3): p. 156-164.

Hancock, R.E.W. & Diamond, G. (2000): The Role of Cationic Antimicrobial Peptides in Innate Host Defences. En: Trends Microbiol. 8(9): p. 402-410.

Haj, K.B., Moissenet, A.; Vu, D.; Thien, H. & Khedher, M. (2011): Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and Modes of Regulation. En: Ann Biol Clin. 69(4): p. 393-403.

Harrison, F., Browning, L.E.; Vos, M. & Buckling A. (2006): Cooperation and Virulence in Acute *Pseudomonas aeruginosa* Infections. En: BMC Biol. 7(4):p. 21.

Hernández V.J. (2011); Evaluación de las propiedades antimicrobianas del péptido derivado de la quimiocina CCL13, CDAP-4, frente a cepas diarreogénicas de *Escherichia coli*. Tesis de pregrado. Facultad de Química UAEM.

Hieshima, K., Ohtani, H.; Shibano, M.; Izawa, D.; Nakayama, T.; Kawasaki, Y.; Shiba, F.; Shiota, M.; Katou, F.; Saito, T. & Yoshie, O. (2003): CCL28 Has Dual Roles in Mucosal Immunity as a Chemokine with Broad-Spectrum Antimicrobial Activity. En: J Immunol. 170(3): p. 1452-1461.

Hoffmann, N., Rasmussen, T.B.; Jensen, P.O.; Stub, C.; Hentzer, M.; Molin, S.; Ciofu, O.; Givskow, M.; Johansen, H.K. & Hoiby, N. (2005): Novel Mouse Model of Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection Mimicking Cystic Fibrosis. En: Infect Immun. 73(4): p. 2504-2514.

Holers V.M. (2014). Complement and Its Receptors: New Insights Into Human Disease. En: Ann Rev Immun. 32:p. 433-459

Holm, B.A., Keicher, L.; Liu, M.Y.; Sokolowski, J & Enhorning, G. (1991): Inhibition of Pulmonary Surfactant Function by Phospholipases. En: J Appl Physiol. 71(1): p. 317-321.

Jeneway, C., Travers, P.; Walport, M. & Shlomchik, M. (2004). Immunobiology. E.U., 6ª Ed., Garland Science. p. 800

Jeneway, C. & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. En Annu. Rev. Immunol. 20: p 197-216.

Jenssen, H., Hamill, P. & Hancock, R.E.W. (2006): Peptide Antimicrobial Agents. En: Clin Microbiol Rev. 19(3): p. 491-511.

Karatan, E. & Watnick, P. (2009): Signals, Regulatory Networks and Materials that Build and Break Bacterial Biofilms. En: Microbiol Mol Biol Rev. 73(2): p. 310-347.

Kavash, R.W.; Costanzo, M.J.; Jo, H.; Daly, T.M. (2012). Platelet factor 4 activity against *P. Falciparum* and its translation to nonpeptidic mimics as antimalarials. En: Cell Host Microbe. 12:p. 815–823.

Kievit, T.R. & Iglewski, B.H. (2000): Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationship. En: Infect Immun. 68(9):4839-4849.

Kikuchi, T., Hackett, N.R. & Crystal, R.G. (2001): Cross-Strain Protection Against Clinical and Laboratory Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Mediated by Dendritic Cells Genetically Modified to Express CD40 Ligand and Pulsed with Specific Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. En: Hum Gene Ther. 12(10): p. 1251-1263.

Kindt, T.J. (2007). Immunologia de Kuby . E.U. Ed. McGraw-Hill Interamericana. p. 560

King, J.D., Kocincova, D.; Westman, E.L. & Lam, J.S. (2009): Lipopolysaccharide Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. En: Innate Immun. 15(5): p. 261-312.

Kipnis, E., Sawa, T. & Wiener-Kronish, J. (2006): Targeting Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenesis. En: Med Mal Infect. 36(2): p. 78-91

Kotarsky, K., Sitnik, K.M.; Stenstad, H.; Kotarsky, H.; Schmidtchen, A. (2010). A Novel Role for Constitutively Expressed Epithelial-derived Chemokines as Antibacterial Peptides in the Intestinal Mucosa. En Mucosal Immunology. 3(1): p. 40-48

Kukavica-Ibrulj & Levesque, R.C. (2008): Animal Models of Chronic Lung Infection with *Pseudomonas aeruginosa*: Useful Tools for Cystic Fibrosis Studies. En: Lab Anim. 42(4):p.389-412.

Laarman, A.J., Bardoel, B.W.; Ruyken, M.; Fernie, J.; Milder, F.J.; van Strijp, J.A. & Rooijackers, S.H. (2012): *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease Blocks Complement Activation Via the Classical and Lectin Pathways. En: J Immunol. 188(1): p. 386-393.

Lambert, P.A. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. En: J Roy Soc Med. 41(95): p. 22-26

Lau, G.W., Hassett, D.J.; Ran, H. & Kong, F. (2004): The Role of Pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* Infection. En: Trends Mol Med. 10(12): p. 599-606.

Lau, G.W., Britigan, B.E. & Hassett, D.J. (2005): *Pseudomonas aeruginosa* OxyR is Required for Full Virulence in Rodent and Insect Models of Infection and for Resistance to Human Neutrophils. En: Infect Immun. 73(4): p. 2550-2553.

Lavoie, E.G., Wangdi, T. & Kzmierczak, B.I. (2012): Innate immune Responses to *Pseudomonas aeruginosa* Infection. En: Microbes Infect. 13(14-15): p. 1133-1145.

Livermore, D.M. (2002): Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? En: Clin Infect Dis. 34(5): p. 634-640.

Love, M.S., Millholland, M.G.; Mishra, S.; Kulkarni, S.; Freeman, K.B.; Pan, W.; Liu, J., Feng, Y.; Yang, K.; Li, Q.; Ye, L.; Han, L. & Wan, H. (2011): Early Production of IL-17 Protects Against Acute Pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Mice. En: FEMS Immunol Med Microbiol. 61(2): p. 179-188.

Luckheeram, R.S., Zhou, R.; Verma, A.D. & Xia B. (2012). CD4+ T Cells: Differentiation and Functions. En Clinic Develp Immun. 2012 (12): p. 1-12

Ma, L., Conover, M.; Lu, H.; Parsek, M.R.; Bayles, K. & Wozniak, D.J. (2009): Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. En: PloS Pathog. 5(3): p. e1000354.

Martinez-Becerra, F., Silvab, D-A.; Domínguez-Ramírez, L.; Mendoza-Hernández, G.; López-Vidal, Y.; Soldevila, G. & García-Zepeda, E.A. (2007): Analysis of the Antimicrobial Activities of a Chemokine-derived Peptide (CDAP-4) on *Pseudomonas aeruginosa*. En: Biochem Biophys Res Commun. 355(2): p. 352-358.

Meriencheck, W.I., Alcorn, J.F.; Palmer, S.M. & Wright, J.R. (2003): *Pseudomonas aeruginosa* Elastase Degrades Surfactant Proteins A and D. En: Am J Respir Cell Mol Biol. 28(4): p. 528-537.

Mendoza, M.T.H. (2004); El Papel del Biofilm en el Proceso Infecciosos y la Resistencia. En: NOVA. 2: p. 71-80.

Mihajlovic, M. & Lazaridis, T. (2010): Antimicrobial Peptides in Toroidal and Cylindrical Pores. En: Biochim Biophys Acta. 1798(8): p. 1485-1493.

Misharin, A.V., Morales-Nebreda, L.; Mutlu, G.M., Budinger, G.R. & Perlman, H. (2013): Flow Cytometric Analysis of Macrophages and Dendritic Cell Subsets in the Mouse Lung. En: Am J Respir Cell Mol Biol. 49(4): p. 503-510.

Morissette, C., Skamene, E. & Gervais, F. (1995): Endobronchial Inflammation Following *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Resistant and Susceptible Strains of Mice. En: Infect Immun. 63(5): p. 1718-1724.

Ortiz-Herrera M.; Gerónimo-Gallegos, A.; Cuevas-Schacht, F.; Pérez-Fernández, L. & Coria-Jiménez R. (2004). Caracterización, por RAPD-PCR, de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística. En: Salud Pública Méx. 46(2): p. 149-157.

Pearson, J.P., Feldman, M.; Iglewski, B.H. & Prince, A. (2000): *Pseudomonas aeruginosa* Cell-to-Cell Signaling is Required for Virulence in a Model of Acute Pulmonary Infection. En: Infect Immun. 68(7): p. 4331-4334.

Proviencili, M., Cardelli, M. & Marchegiani, F. (2011): Inflammation, Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Aging. En: Curr Opin Pulm Med. 17(suppl1): p. S3-S10.

Rasamiravaka, T., Labtani, Q.; Duez, P. & El Jazir, M. (2014): The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. En: Biomed Res Int. 1: p. 1-18

Reddy, K.V., Yedery, R.D. & Aranha C. (2004): Antimicrobial Peptides: Premises and Promises. En: Int J Antimicrob Agents. 24(6): p. 536-547.

Ross, M.H., Kaye, G.I. & Pawlina, W. (2005): Histología Texto y Atlas a Color con Biología Celular y Molecular. Editorial Panamericana. 4 Ed. P. 570-562.

Rossi, L.M., Rangasamy, P.; Zhang, J.; Qiu, X.-Q. y Wu, G. Y. (2008): Research Advances in the Development of Peptide Antibiotics. En: J Pharm Sci. 97(3): p. 1060– 1070

Rot, A. & von Andrian, U.H. (2004): Chemokines in Innate and Adaptive Host Defense: Basic Chemokinese Grammar for Immune Cells. En: Annu Rev Immunol. 22: p. 891-928.

Ryder, C., Byrd, M. & Wozniak, D.J. (2007): Role of Polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. En: Curr Opin Microbiol. 10(6): p.

644-648.

Sadikot, R.T., Blackwell, T.S.; Christman, J.W. & Prince, A.S. (2005): Pathogen-Host Interaction in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. Ed: Am J Respir Crit Care Med. 171(11):1209-1223.

Shawar, R.M., MacLeod, D.L.; Garber, R.L.; Burns, J.L.; Stapp, J.R.; Clausen, C.R. & Tanaka, S.K. (1999): Activities of Tobramycin and Six Other Antibiotics Against *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Patients with Cystic Fibrosis. En: Antimicrob Agents Chemother. 43(12): p. 2877-2880.

Smet, K.D. & Contreras, R. (2005): Human Antimicrobial Peptides: Defensins, Cathelicidins and Histatins. En: Biotechnol Lett. 27(18): p. 1337-1347.

Sobirk, S.K.; Morgelin, M.; Egesten, A.; Bates, P.; Shannon, O.; Collin, M. (2013). Human chemokines as antimicrobial peptides with direct parasitocidal effect on *Leishmania mexicana* in vitro. En: PLoS ONE 8:1-12.

Steckbeck, J.D.; Deslouches, B.; Montelaro, R.C. (2014). Antimicrobial peptides: new drugs for bad bugs? En: Expert Opin Biol Ther. 14(1):p 11-14.

Strateva, T. & Yordanov, D. (2009): *Pseudomonas aeruginosa* a Phenomenon of Bacterial Resistance. En: J Med Microbiol. 58(Pt 9): p. 1133-1148.

Sutherland, I.W. (2004): Biofilm Exopolysaccharides: a Strong and Sticky Framework. Microbiology. 147 (Pt1):3-9.

Sutherland, I.W. (2001): Exopolysaccharides in Biofilms, Flocs and Related Structures. En: Water Sci Technol. 43(6): p. 77-86.

Tobón G.J., Izquierdo J.H. y Cañas C.A. (2013) B lymphocytes: Development, Tolerance and Their Role in Autoimmunity- Focus on Systemic Lupus Erythematosus. En: Autoimm Dises 2013(1): p 1-12

Tosi, M.F. (2006): Innate Immune Responses to Infection. En: J Allergy Clin Immunol. 116(2): p. 241-249.

Valdivia-Silva J, Medina-Tamayo J, Garcia-Zepeda EA.(2015); Chemokine-Derived Peptides: Novel Antimicrobial and Antineoplastic Agents. En: Int J Mol Sci. 16(6):p. 12958-85.

Wagner, C., Kotsougiani, D.; Pioch, M.; Prior, B.; Wentzensen, A. & Hänsh, G.M.

(2008): T Lymphocytes in Acute Bacterial Infection: Increased Prevalence of CD11b+ Cells in the Peripheral Blood and Recruitment to the Infected Site. En: Immunology. 125(4): p.503-509.

Williams, B.J., Dehnbostel, J. & Blackwell, T.S. (2010): *Pseudomonas aeruginosa*: Host Defence in Lung Diseases. Respirology. 15(7): p. 1037-1056.

Yanagihara, K., Tomono, K.; Sawai, T.; Hirakata, Y.; Kadota, J.; Koga, H.; Tashiro, T. & Kohno, S. (1997): Effect of Clarithromycin on Lymphocytes in Chronic Respiratory *Pseudomonas aeruginosa* Infection. En: Am J Respir Crit Care Med. 155(1): p. 337-342.

Yang, D., Chen, Q.; Hoover, D.M.; Staley, P.; Tucker, K.D.; Lubkowski, J. & Oppenheim, J.J. (2003): Many Chemokines Including CCL20/MIP-3 Display Antimicrobial Activity. En: J Leukoc Biol. 74(3): p. 488-455

Yang, O.O.; Garcia-Zepeda, E.A.; Walker, B.D.; Luster, A.D. (2002) Monocyte chemoattractant protein-2 (CC chemokine ligand 8) inhibits replication of human immunodeficiency virus type 1 via CC chemokine receptor 5. En: J. Infect. Dis. 185: p.1174–1178.

Yeaman, M.R. (1997): The Role of Platelets in Antimicrobial Host Defense. En: Clin Infect Dis. 25(5): p. 951-970.

Yeaman, M.R. & Yount, N.Y. (2003): Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. En: Pharmacol Rev. 55(1): p. 27–55.

Yeaman, M.R., Yount, N.Y.; Waring, A.J.; Gank, K.D.; Kupferwasser, D.; Wiese R.; Bayer, A.S. & Welch, W.H. (2007): Modular Determinants of Antimicrobial Activity in Platelet Factor-4 Family Kinocidins. En: Biochim Biophys Acta. 1768(3): p. 609-619.

Zanetti, M. (2004): Cathelicidins, Multifunctional Peptides of the Innate Immunity. En: J Leukoc Biol. 75(1): p. 39-51

14. ANEXO

Anexo 1.

Norma CLSI M7-A6. Procedimiento para las Pruebas de CMI por Microdilución en Caldo.

1. Células para el inóculo

Las colonias aisladas deben ser seleccionadas de un cultivo en placa de agar nutritivo después de 18 a 24 horas. Se debe usar un medio no selectivo, como agar sangre.

2. Prepare la suspensión del inóculo.

a. Método de crecimiento

- De la placa de agar, seleccione de tres a cinco colonias bien aisladas y con el mismo tipo morfológico. La parte superior de cada colonia se toca con un asa de alambre y se transfiere a un tubo que contenga 4-5 mL de caldo apropiado, como caldo tríptico de soya.
- El caldo de cultivo se incuba a 35°C hasta que alcance la turbidez equivalente a 0,5 del estándar de McFarland (usualmente 4-6 horas).
- La turbidez del cultivo creciendo activamente en caldo se ajusta con solución salina o caldo estéril. La suspensión resultante contiene aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ (UFC/mL). Para ejecutar este paso apropiadamente, se debe usar ya sea un aparato fotométrico o, si se hace visualmente, luz adecuada para comparar visualmente el tubo con el inóculo y el estándar de McFarland al 0,5 frente a una cartulina con fondo blanco y rayas negras de contraste.

b. Método de suspensión directa de colonias

- Como un método alternativo, el inóculo puede ser preparado efectuando una suspensión directa en caldo o solución salina de las colonias aisladas y ajustando su turbidez a 0,5 del estándar de McFarland.

3. Mezclar la suspensión del inóculo antes de diluirlo.

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de turbidez del inóculo al 0,5 del estándar de McFarland, mezcle la suspensión y dilúyala para que la concentración final en cada celdilla sea 5×10^5 (UFC/mL). Añada 2,0 mL de la suspensión original a 38 mL de agua (dilución 1:20). Las puntas del inoculador repartirán 0,01 mL (dilución 1:10) en cada celdilla. Inocule cuidadosamente la placa de CIM para evitar

salpicar de una celdilla a otra. Si no se ajusta y diluye el inóculo dentro de 15 minutos después de preparado se puede afectar la concentración de microorganismos y por consiguiente los resultados de la prueba.

4. Control de pureza del inóculo

Tome un asa llena con la suspensión de la celdilla con el cultivo control de crecimiento o del reservorio del inóculo, y proceda a realizar un subcultivo en una placa de agar sangre. Incube durante la noche a 37° C en 3-5% de CO₂, la cual es una atmósfera que favorece la detección de una amplia gama de contaminantes. Examine para comprobar que no haya contaminación antes de proceder con la lectura de la placa de CI

Anexo 2**Anticuerpos usados en el analisis de citometria de flujo**

Anticuerpo	Marcador	Canal de lectura
F4-80	FITC	FL1
CD3	PE	FL2
CD4	PE-CY5	FL3
CD8	FITC	FL1
CD19	PE	FL2
GR1	PerCP	FL3
CD1	FITC	FL1

Anexo 3**Equipos**

Incubadora-Shaker
New Brunswick Scientific
Edison NJ USA
G24 Enviromental Incubator Shaker

Incubadora
Boekel Scientific
Modelo 13 3000

Lector de
Modulos II Microplate Rader

Ultracongelador
REVCO
Forn Scientific Bio-Freezer

Potenciometro
Magnetic Stirner

Espectrofotómetro
Ultrospec II
CKB Biochrom

Balanza
Sartorius Mecatronic
Modelo TE1535

Microscopio
LEICA DM750

Citómetro de Flujo
FACSCalibur
BD Bioscience

Homogeneizador
Polytron PT 2500E

15. APÉNDICE

Apéndice 1.

Concentración Mínima Inhibitoria. Preparación de la placa de reacción.

El llenado de la placa se realizó de acuerdo al siguiente esquema:

Diluciones				Tratamientos	Condiciones Finales
TSB 1%	CDAP-4				
50 μ L	0 μ L	○ ○ ○ ○	→	Control de contaminación	50 μ L TSB 1%
50 μ L	0 μ L	○ ○ ○ ○	→	Control negativo	50 μ L TSB 1% + 10 μ L SBT
0 μ L	100 μ L	○ ○ ○ ○	→	CDAP-4 256 μ g /mL	50 μ L CDAP-4+ 10 μ L SBT
50 μ L	50 μ L	○ ○ ○ ○	→	CDAP-4 128 μ g /mL	50 μ L CDAP-4+ 10 μ L SBT
50 μ L	50 μ L	○ ○ ○ ○	→	CDAP-4 64 μ g /mL	50 μ L CDAP-4+ 10 μ L SBT
50 μ L	50 μ L	○ ○ ○ ○	→	CDAP-4 32 μ g /mL	50 μ L CDAP-4+ 10 μ L SBT
50 μ L	50 μ L	○ ○ ○ ○	→	CDAP-4 16 μ g /mL	50 μ L CDAP-4+ 10 μ L SBT
50 μ L	50 μ L	○ ○ ○ ○	→	CDAP-4 8 μ g /mL	50 μ L CDAP-4+ 10 μ L SBT

SBT = Suspensión Bacteriana de Trabajo

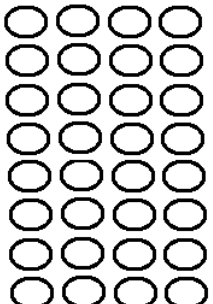
Y con el siguiente orden:

1. Se inicia con el llenado del medio de cultivo (TSB 1%)
2. Posteriormente se realiza la dilución del péptido
3. Finalmente se coloca la suspensión bacteriana

Apéndice 2.

Evaluación del efecto de CDAP-4 sobre la biopelícula de *P. aeruginosa*. Preparación de la placa de reacción.

El llenado de la placa se realiza como lo muestra el diagrama, con las diferentes indicaciones para cada condición.

Diluciones		Tratamientos		Condiciones Finales
TSB 1%	CDAP-4			
50 μ L	0 μ L		Control de contaminación	50 μ L TSB 1%
50 μ L	0 μ L		Control negativo	50 μ L TSB 1% + 10 μ L SBT
0 μ L	100 μ L		CDAP-4 256 μ g /mL	50 μ L CDAP-4+ 10 μ L SBT
50 μ L	50 μ L		CDAP-4 128 μ g /mL	50 μ L CDAP-4+ 10 μ L SBT
50 μ L	50 μ L		CDAP-4 64 μ g /mL	50 μ L CDAP-4+ 10 μ L SBT
50 μ L	50 μ L		CDAP-4 32 μ g /mL	50 μ L CDAP-4+ 10 μ L SBT
50 μ L	50 μ L		CDAP-4 16 μ g /mL	50 μ L CDAP-4+ 10 μ L SBT
50 μ L	50 μ L		CDAP-4 8 μ g /mL	50 μ L CDAP-4+ 10 μ L SBT

SBT = Suspensión Bacteriana de Trabajo

A) Prevención de la formación del biopelícula

- La preparación de la placa se realiza primero al colocar el PBS y después el péptido, la placa se mantiene en agitación durante 12h a 4°C
- Se retira la solución y se reemplaza por el medio de cultivo y la suspensión bacteriana

B) Inhibición de la formación de la biopelícula

- Se coloca primero el medio, después el péptido y finalmente la suspensión bacteriana, la placa se incuba y procesa.

C) Inhibición de la biopelícula

- La placa se prepara colocando el medio de cultivo y la suspensión bacteriana, se incuba y posteriormente se agrega el péptido.

Apéndice 3

Medios de cultivo

Caldo Luria-Bertoni (LB)

Reactivo	Cantidad
Peptona de Caseína	10 g
(BDBioxon)	5 g
Extracto de Levadura	10 g
(BDBioxon)	1000 mL
NaCl (J.T. Baker)	
Agua Megapura	

Caldo Triptona Soya (TSB)

Reactivo	Cantidad
Medio TSB (BDBioxon)	30 g
Agua Megapura	1000 mL

Placas de Agar LB

Reactivo	Cantidad
Peptona de Caseína	10 g
(BDBioxon)	5 g
Extracto de Levadura	10 g
(BDBioxon)	10 g
NaCl (J.T. Baker)	15 g
Agar (DIFCO)	1000 mL
Agua Megapura	

Placas de Agar PIA

Reactivo	Cantidad
Medio PIA (BDBioxon)	45 g
Glicerina	10 mL
Agua Megapura	990 mL

Todos los medios y caldos se esterilizaron a 120°C por 15 minutos

Soluciones

PBS 10X

Reactivo	Cantidad
NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄	11,6 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Agua Megapura	1000,0 mL

PBS 1X

Reactivo	Cantidad
PBS 10X	100,0 mL
Agua Megapura	900,0 mL

Solución 256 µg/mL de CDAP-4

Reactivo	Cantidad
NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄	11,6 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Agua Megapura	1000,0 mL

Solución de TSB 1%

Reactivo	Cantidad
CDAP-4 (10mg/mL)	25,6 µL
TSB 1%	974,4 µL

Cristal violeta 1%

Reactivo	Cantidad
Cristal Violeta	0,1 g
Agua Megapura	100 mL

16. ÍNDICE DE FIGURAS

NOMBRE DE LA FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Respuesta de la inmunidad innata frente a diferentes patógenos	7
Figura 2. Modelos moleculares de diferentes clases de péptidos catiónicos	9
Figura 3. Mecanismos de acción de los AMPs permeabilizadores y no permeabilizadores	12
Figura 4. Factores de Virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	23
Figura 5. Mecanismo de infección de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el tracto respiratorio	25
Figura 6. Modelo murino de infección crónica.	37
Figura 7. Curvas de crecimiento de diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i> .	40
Figura 8 Placas de crecimiento para determinación de la CMI.	42
Figura 9. Actividad del péptido CDAP-4 sobre la biopelícula generada por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
Figura 10. Tamaño y forma de las perlas de agar.	46
Figura 11. Monitoreo de bacterias viables durante la infección crónica.	47
Figura 12. Efecto de CDAP-4 en las UFC del tejido pulmonar infectado con <i>P. aeruginosa</i> (MUC).	48
Figura 13. Histología del tejido pulmonar generado por una infección de <i>P. aeruginosa</i> (MUC) con y sin tratamiento de CDAP-4 en el día cero.	50
Figura 14. Histología del tejido pulmonar generado por una infección de <i>P. aeruginosa</i> (MUC) con y sin tratamiento de CDAP-4 en el día tres	51
Figura 15. Histología del tejido pulmonar generado por una infección de <i>P. aeruginosa</i> (MUC) con y sin tratamiento de CDAP-4 en el día	52

siete.

Figura 16. Histología del tejido pulmonar generado por una infección de <i>P. aeruginosa</i> (MUC) con y sin tratamiento de CDAP-4 en el día catorce.	53
Figura 17. Histología del tejido pulmonar generado por una infección de <i>P. aeruginosa</i> (MUC) con y sin tratamiento de CDAP-4 en el día veintiuno.	54
Figura 18. Análisis morfométrico del infiltrado inflamatorio de los grupos infectados con tratamiento y sin tratamiento a diferentes tiempos de infección.	57
Figura 19 <i>Representación de las poblaciones del LBA de acuerdo al análisis de citometría de flujo (FACS).</i>	58
Figura 20. Análisis de las poblaciones celulares del LBA correspondientes macrófagos.	60
Figura 21. Análisis de las poblaciones celulares del LBA correspondientes a neutrófilos	61
Figura 22. Análisis de las poblaciones celulares del LBA correspondientes a los linfocitos T cooperadores (Th).	62
Figura 23. Análisis de las poblaciones celulares del LBA correspondientes a los linfocitos T citototóxicos (Tc).	63
Figura 24. Análisis de las poblaciones celulares del LBA correspondientes a linfocitos B.	64

17. ÍNDICE DE TABLAS

NOMBRE DE LA TABLA	PÁGINA
Tabla 1 Características de la Inmunidad Innata e Inmunidad Adaptativa	4-5
Tabla 2 Características de las Quimiocinas	15-16
Tabla 3. Actividad antimicrobiana de las quimiocinas	18
Tabla 4. Tiempos de generación de las cepas empleadas de <i>P. aeruginosa</i>	20
Tabla 5. Actividad Antimicrobiana de CDAP-4 frente a cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	41
Tabla 6. Actividad Antimicrobiana de CDAP-4 frente a cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	43

