



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CETPI, UNA NUEVA PROTEÍNA DE UNIÓN A LIPOPOLISACÁRIDOS Y DE
PROTECCIÓN EN EL CHOQUE SÉPTICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
ISMAEL LUNA REYES

TUTOR PRINCIPAL

Jaime Mas Oliva
Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Miguel Ángel Ávila Rodríguez
Facultad de Medicina

Alejandro Zentella Dehesa
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Ciudad de México. Junio, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos institucionales

A CONACYT a través del programa de Becas de Estudios de Posgrado Nacionales en el periodo Agosto 2016 - Julio 2018. Número de Registro Becario:609284; Numero de Apoyo:45060

A la M.C. Victoria López y la M.V.Z Dafne Garduño de la unidad de MicroPET de la Unidad de PET/Ciclotrón de la Facultad de Medicina.

A la M.V.Z. Claudia Rivera Cerecedo y al M.V.Z Héctor Malagón de la Unidad de Bioterio del Instituto de Fisiología Celular

Al Dr. Jorge Ramírez de la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular

Al Taller De Mantenimiento Electrónico, Eléctrico y Mecánico del Instituto de Fisiología Celular

A la Unidad de Computo del Instituto de Fisiología Celular

Agradecimientos personales

A mi tutor el Dr. Jaime Mas Oliva por toda su confianza, apoyo y enseñanzas brindados durante este proyecto.

A los integrantes de mi comité tutor, el Dr Miguel ángel Ávila Rodríguez y el Dr Alejandro Zentella. Dehesa, por sus consejos y asesoría a lo largo de la maestría.

A los integrantes del comité sinodal Dr. Alejandro Alagón Cano, Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo, Dr. Carlos Rosales Ledezma, Dr. Enrique Ortega Soto y Dr. Rolando Hernández Muñoz, por sus revisiones y valiosos comentarios

A la M.C. Blanca Alicia Delgado Coello, por sus consejos y todo el apoyo brindado en el laboratorio.

A mis compañeras de laboratorio: la Dra. Roxana Gutiérrez, la M.C. Eréndira Pérez y la Biol. Sandra Calixto, por su amistad y consejos.

A mis padres Venerando Luna y Yesenia Reyes y mis hermanos Octavio y Laura, por todo su apoyo y comprensión.

A mis amigos Teo, Silvia, Salomón, Isaí y Yessica, por su amistad y apoyo.

A todos mis amigos biomédicos, por sus siempre bien recibidos consejos y opiniones.

Lista de abreviaturas

%ID/cc	Porcentaje de Dosis por Centímetro Cuadrado
%ID/órgano	Porcentaje de Dosis por Órgano
%ID/ mg tejido	Porcentaje de Dosis por Miligramo de Tejido
18 FDG	2-[18]Fluoro-2-Desoxi-D-Glucosa
BPI	Proteína Incrementadora de la Permeabilidad/Bactericida
CETP	Proteína transferidora de Esteres de Colesterol
CETPI	Isoforma de la Proteína Transferidora de Esteres de Colesterol
CICUAL	Comité interno para el cuidado y uso de animales de laboratorio
DAMPS	Patrón Molecular Asociado a Daño
HDP	Péptido de Defensa del Hospedero
IL-1A	Interleucina 1-alfa
IL-1B	Interleucina 1-beta
IL-8	Interleucina 8
LBP	Proteína de Unión a Lipolisacáridos
LPS	Lipopolisacáridos
MD2	Antígeno de Linfocito 96
MIP-1B	Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1 beta
MMP9	Metaloproteinasa de la Matriz 9
mRNA	RNA mensajero
NCAM	Molécula de Adición de Células Neuronales
PAM	Presión Arterial Media
PAMPS	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PET	Tomografía de Emisión de Positrones
PLTP	Proteína de Transferencia de Fosfolípidos
PLUNC	Clon proteico de epitelio nasal, palatino y pulmonar
PRR	Receptor de Reconocimiento de Patrones
SUV	Valor de Captura Estándar
TLR4	Receptor Tipo Toll 4
TLRs	Receptores Tipo Toll
TNFa	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
VOI	Volumen de Interés

Índice

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Infección, sepsis y choque séptico.....	2
2.2. Lipopolisacáridos.....	6
2.3. Proteínas y péptidos de defensa del hospedero	9
2.4. CETP, CETPI y el péptido VSAK	13
2.5. Panorama actual sobre la sepsis y choque séptico.....	18
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVO GENERAL	21
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
7. MATERIALES Y MÉTODOS	22
7.1. Péptido VSAK.....	22
7.2. Lipopolisacáridos.....	22
7.3. Animales.....	23
7.4. Equipo de microPET	24
7.5. Estudio de microPET - LPS 300ng/kg.....	25
7.6. Estudio de microPET - LPS 450ng/kg.....	28
7.7. Proceso de adquisición	31
7.8. Reconstrucción y análisis de datos de captura.	31
7.9. Cuantificación de proteínas.....	32
7.10. Medición de metabolitos plasmáticos	32
7.11. Medición citocinas pro-inflamatorias.....	33
7.12. Análisis estadístico.....	33
8. RESULTADOS	34
8.1. Primer Experimento - Modelo de Choque Séptico Con LPS 300 ng/Kg	34
8.1.1. Análisis cualitativo	34
8.1.2. Análisis cuantitativo.....	41
8.1.2.1. <i>Valor de captura estándar</i>	41
8.1.3. Cambios en glucosa e insulina	44
8.1.4. Marcadores pro-inflamatorios	45
8.2. Segundo Experimento - Modelo de Choque Séptico Con LPS 450 ng/Kg	48
8.2.1. Análisis cualitativo	48
8.2.2. Análisis cuantitativo.....	54
8.2.2.1. <i>Actividad específica final</i>	54
8.2.2.2. <i>Valor de captura estándar</i>	56
8.2.2.3. <i>Valor de captación total</i>	58
8.2.3. Monitoreo de signos vitales.....	59
8.2.4. Cambios en glucosa e insulina	60
8.2.5. Marcadores pro-inflamatorios	61
9. DISCUSIÓN	64
10. CONCLUSIONES	74
11. PERSPECTIVAS	75
12. BIBLIOGRAFÍA	76

1. Resumen

Hace algunos años en nuestro laboratorio se describió una nueva variante de la Proteína Transferidora de Esteres de Colesterol (CETP), la cual fue llamada CETPI. A pesar de que estas proteínas presentan una conservación estructural mayor al 90%, esta mínima diferencia en sus estructuras conlleva un cambio radical en las funciones que desempeñan. Mientras que CETP tiene un papel muy importante en la homeostasis de lípidos y esterios de colesterol. CETPI es más parecida a una proteína de unión a Lipopolisacáridos (LPS), por lo que podría tener un papel en la respuesta del organismo ante infecciones bacterianas.

La función de CETPI ha sido uno de los principales temas de estudio en nuestro laboratorio de los últimos años. CETPI se ha estudiado utilizando péptidos sintéticos derivados de la región carboxilo terminal de esta proteína. Uno de los péptidos generados a partir de esta región presento una muy alta capacidad de unión de LPS, con propiedades neutralizantes que se han observado *in vitro* e *in vivo*. Este péptido conocido como VSAK corresponde a los últimos 18 aminoácidos de CETPI, los cuales representan la región de divergencia entre CETP y CETPI. Las propiedades observadas en este péptido plantearon la posibilidad de que la administración de VSAK pudiera tener un efecto benéfico en condiciones patológicas producidas por los LPS, como lo son la sepsis y el choque séptico. Estas condiciones son el resultado de una respuesta sistémica descontrolada ante una infección. Al ser moléculas altamente inmunógenas, los LPS son uno de los principales agentes responsables del desarrollo esta condición en infecciones producidas por bacterias Gram negativas.

En este proyecto estudiamos la capacidad del péptido VSAK evitar los efectos deletéreos producidos por los LPS *in vivo*. Utilizando un modelo animal de choque séptico por administración de LPS en conejos enanos. Aprovechamos el uso de la Tomografía de Emisión de Positrones (PET), para analizar el efecto de los LPS en la captación de ¹⁸F₂FDG en diversos órganos durante el establecimiento de la condición de choque séptico asociándolo con cambios en moléculas inflamatorias liberadas durante el choque séptico. Esto nos permitió determinar que la administración de VSAK en este modelo tiene un efecto protector, ya que este evitó que se produjera una reducción en la captación de ¹⁸F₂FDG producida por los LPS. Además, este efecto protector fue observado en el análisis de moléculas pro-inflamatorias, en donde la administración de VSAK redujo el nivel varias de estas moléculas en plasma. En adición, la administración de VSAK evito el establecimiento de una condición similar a resistencia a la insulina, asociada al efecto inflamatorio de los LPS.

Estos resultados refuerzan la capacidad de VSAK para evitar que los LPS produzcan sus efectos deletéreos *in vivo*, y plantean la posibilidad del uso del péptido VSAK como un agente que pudiera ser de utilidad en el ámbito clínico para evitar el desarrollo de choque séptico.

2. Introducción

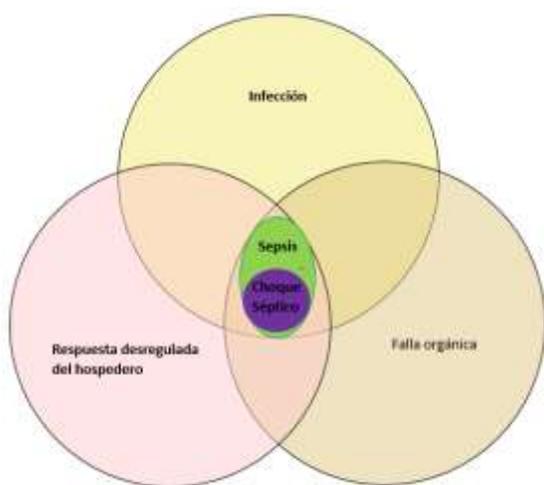
2.1. Infección, sepsis y choque séptico

En la actualidad, las infecciones han resurgido como uno de los problemas de salud pública más importantes a los que se deberá hacer frente en los próximos años. Los estados agravados de procesos infecciosos, como la sepsis y el choque séptico son una de las principales causas de muerte en pacientes de Unidades Cuidados Intensivos. En estos individuos el estado de sepsis o choque séptico debido al agravamiento de un proceso infeccioso no es necesariamente la causa primaria de la admisión al ICU, ya que en muchos de estos casos este estado evoluciona a partir de una infección nosocomial. El desarrollo de sepsis y choque séptico sucede con alta frecuencia en individuos que presentan una comorbilidad que compromete el funcionamiento normal del sistema inmune como lo son pacientes con cáncer, VIH/SIDA, cirugía mayor, así como personas con traumas o quemaduras severas. A pesar de que no se cuenta con datos concretos, en la actualidad se estima que en el mundo alrededor de 3 millones de muertes anuales están relacionadas con infecciones o complicaciones derivadas de las mismas (Cecconi et al., 2018; Singer et al., 2016).

Los procesos infecciosos pueden agravarse hasta conducir al desarrollo de un estado de sepsis o choque séptico, los cuales pueden comprometer la vida del individuo. Estos estados se caracterizan por la presencia de una infección que produce una respuesta sistémica (Figura 1). Esta respuesta del hospedero es la responsable de producir los efectos más dañinos de la sepsis, incluyendo las alteraciones en el funcionamiento normal del sistema inmune, el daño a diversos órganos y sistemas, así como de los eventos que conducen a la hipotensión no reversible característica del choque séptico (Angus & van der Poll, 2013)

La presencia de cualquier organismo patógeno en el hospedero puede producir una respuesta sistémica y conducir al desarrollo de sepsis o choque séptico. Sin embargo, las infecciones producidas por bacterias presentan una incidencia especialmente alta en el desarrollo de sepsis o choque séptico. Esta incidencia de sepsis y choque durante infecciones bacterianas está asociada con factores como

la resistencia a antibióticos, la cual favorece la diseminación de la infección y aumenta el tiempo de exposición del hospedero al agente patógeno y las moléculas producidas por éste (López-Bojórquez et al., 2002).



Indicaciones actuales y terminología	Sepsis	Choque Séptico
Definición 2015	La sepsis es una disfunción orgánica que pone en peligro la vida causada por una respuesta desregulada del hospedero a una infección	El choque séptico es un subtipo de sepsis en el cual las subyacentes anormalidades circulatorias, celulares y metabólicas son suficientes para incrementar sustancialmente la mortalidad
Criterios clínicos 2015	Sospecha o infección documentada con un incremento agudo (>2 puntos) en la escala SOFA (aproximación de la disfunción orgánica).	Sepsis incluyendo la necesidad de administrar vasoconstrictores para elevar la PAM a <65 mmHg y lactato >2 mmol/L (18mg/dL) a pesar de la adecuada resucitación con fluidos
Códigos recomendados del ICD		
ICD-9	995.92	785.52
ICD-10	R65.20	R65.21
Marco de referencia de implementación para codificación e investigación	Identificar la infección sospechada utilizando ordenes concomitantes para cultivos sanguíneos junto con administración de antibióticos (oral y parenteral) en periodos específicos. Dentro del periodo de sospecha de infección Identificar sepsis utilizando criterios clínicos para disfunción orgánica Evaluar criterios de choque, utilización de vasoconstrictores, PAM <65 mmHg y Lactato >2 mmol/L (18mg/dL)	

Figura 1. Definiciones actuales de sepsis y choque séptico, según el Tercer Consenso Internacional de Definiciones para Sepsis o Choque Séptico. A) Para considerar que existe un estado de sepsis deben estar presentes tres condiciones: una desregulación de la respuesta del hospedero, disfunción orgánica que amenace la vida y la presencia de una infección. **B)** Tabla de definiciones Sepsis-3. Bajo las definiciones de este consenso se asume al choque séptico como un estado dentro de la sepsis en la que existe una hipotensión sistémica insensible a vasoconstrictores y a resucitación con fluidos. SOFA, Evaluación de la Falla Orgánica Asociada a la sepsis (del inglés *Sepsis-related Organ Failure Assessment*); ICD, Clasificación Internacional de Enfermedades International (del inglés *Classification of Diseases*); PAM, Presión Arterial Media (Delano & Ward, 2016, Singer ,2016).

Uno de los aspectos más críticos para el desarrollo de sepsis y choque séptico es la activación de mecanismos moleculares que conllevan al desarrollo de la respuesta sistémica del sistema inmune en el hospedero. Esta respuesta sistémica se caracteriza por un desbalance en los sistemas que regulan la respuesta inmune del hospedero al verse sobrepasada su capacidad para amortiguar el desarrollo normal de este proceso. Esto sucede debido una hiper-activación inducida por la presencia del patógeno, esta situación conlleva al desarrollo de un estado hiper-inflamatorio que compromete al individuo de forma aguda, el cual es seguido de un estado de agotamiento del sistema inmune que representa un riesgo a largo plazo (Delano & Ward, 2016) .

El reconocimiento de moléculas propias de los agentes patógenos es el evento principal que favorece el desarrollo de la respuesta sistémica del hospedero. El sistema inmune innato tiene un papel protagónico para que pueda ocurrir el reconocimiento del patógeno y en el inicio del desarrollo de la respuesta del hospedero ante este. Diversas moléculas presentes en el organismo patógeno pueden suscitar el desarrollo de la respuesta inmune, en su conjunto estas moléculas son conocidas como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPS, del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (Gentile & Moldawer, 2013). Los PAMPS pueden ser reconocidos a través de receptores que en su conjunto se conocen como Receptores de Reconocimiento Patrones (PRR, del inglés *Pattern Recognition Receptor*). Estos receptores están presentes en las células del sistema inmune innato y también en una gran cantidad de células que interactúan con zonas críticas para la entrada y diseminación de los patógenos, como lo son las células que forman los epitelios del tracto digestivo, respiratorio y genitourinario, así como el endotelio (Van Amersfoort et al., 2003). Los PRR comprenden a diversas familias de receptores capaces de reconocer una cantidad limitada de PAMPS y de Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMPS, del inglés *Damage-Associated Molecular Patterns*), el reconocimiento de estos patrones moleculares puede llevarse a cabo directamente por los receptores o requerir de proteínas que funcionan como adaptadoras para permitir el reconocimiento mediado por los PRR (Eckert et al., 2013).

Los Receptores Tipo TOLL (TLRs, del inglés Toll-Like Receptors) son una de las principales familias de receptores incluidos entre los PRR, estos receptores median el reconocimiento de diversos PAMPS como los son DNA, RNA y componentes de membranas de diversos microorganismos. Dentro de los TLRs, el receptor Tipo 4 (TLR4, del inglés *Toll-Like Receptor 4*) juega en papel muy importante en el desarrollo de la respuesta inmune del hospedero durante una infección bacteriana (Tsujiimoto et al., 2007). Este receptor está involucrado en el reconocimiento de los Lipolisacáridos (LPS), esta molécula es considerada uno de los PAMPS más inmunógenos que se conocen, además de ser el principal responsable del desarrollo de sepsis y choque séptico en infecciones producidas por bacterias Gram negativas (Rittirsch, Flierl, & Ward, 2008).

El reconocimiento de los LPS mediado por los TLR4, involucra un conjunto de proteínas intermediarias necesarias para la activación de los receptores. La primera proteína involucrada en el reconocimiento es la Proteína de Unión a LPS (LBP, del inglés *LPS-Binding Protein*), esta proteína es capaz de unirse a los LPS liberados por la lisis de las bacterias y que pasan a la circulación del hospedero. Una vez que los LPS se unen a LBP se forma un complejo lipoproteico que se mantiene en circulación. Es entonces cuando este complejo puede unirse con la proteína CD14, la cual puede encontrarse de forma soluble o anclada a la membrana plasmática a través de una molécula de glucofosfatidil inositol. El complejo formado por LPS, LBP y CD14 puede ser reconocido por TLR4 e involucra a un segundo complejo formado por TLR4 y la proteína MD2. Una vez que los LPS son reconocidos por los TLR4, se produce la activación de vías de señalización que conllevan a cambios en el metabolismo de las células, se promueve la expresión de genes asociados con la inflamación, así como la liberación de citocinas y otras moléculas que favorecen la reacción pro-inflamatoria inicial (Pop-Began et al., 2014).

2.2. Lipopolisacáridos

A pesar de que una gran cantidad de PAMPS pueden inducir la activación del sistema inmune, la capacidad inmunógena de estas moléculas presenta una gran variación entre los distintos PAMPS. Uno de los PAMPS más inmunógenos que se conocen son los LPS, los cuales son uno de los principales componentes bacterianos que se liberan a la circulación durante el curso de una infección y son considerados el principal agente etiológico para el desarrollo de la respuesta sistémica del hospedero, durante una infección por bacterias Gram negativas (Jackson & Kropp, 1992; Jerala, 2007).

Los LPS pueden llegar a representar hasta un noventa por ciento del total de componentes de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Estas moléculas son polisacáridos unidos a una base lipídica conservada, y presentan tres regiones conservadas dentro de su estructura: el lípido A, la región del núcleo y el antígeno O (Figura 2). A pesar de que estas tres regiones están presentes en los prácticamente todos LPS, cada región presenta un grado de variabilidad distinta e independiente de las otras regiones. Algunas de estas regiones pueden presentar grados de variabilidad muy elevados que están asociados con funciones particulares de esta molécula en las bacterias (Beutler & Rietschel, 2003).

El lípido A es la región más conservada de los LPS en distintas especies bacterianas, esta región está formada por un disacárido de N-acetilglucosamina unido a través de un enlace β 1-6 glicosídico. Este dímero suele presentar grupos fosfatos unidos a los grupos alcohol, donde la presencia de estos grupos fosfatos contribuye a la carga neta negativa que presentan los LPS. En esta región también se encuentran presentes ácidos grasos los cuales están unidos al disacárido de glucosamina mediante enlaces éster. El dímero de glucosamina puede tener unidas de cuatro a seis cadenas de ácidos grasos, y se considera que un mayor número de cadenas de ácidos grasos contribuye a una mayor capacidad inmunógena de los LPS (Schumann et al., 1990). La región del lípido A tiene una especial importancia para el reconocimiento por parte del sistema inmune, ya que esta región de los LPS interactúa con las proteínas de unión a LPS. La interacción con estas proteínas

permite que los LPS sean reconocidos eficientemente por el sistema inmune innato, lo cual favorece el desarrollo de la respuesta del hospedero ante la presencia de un microorganismo invasor (Kaconis et al., 2011).

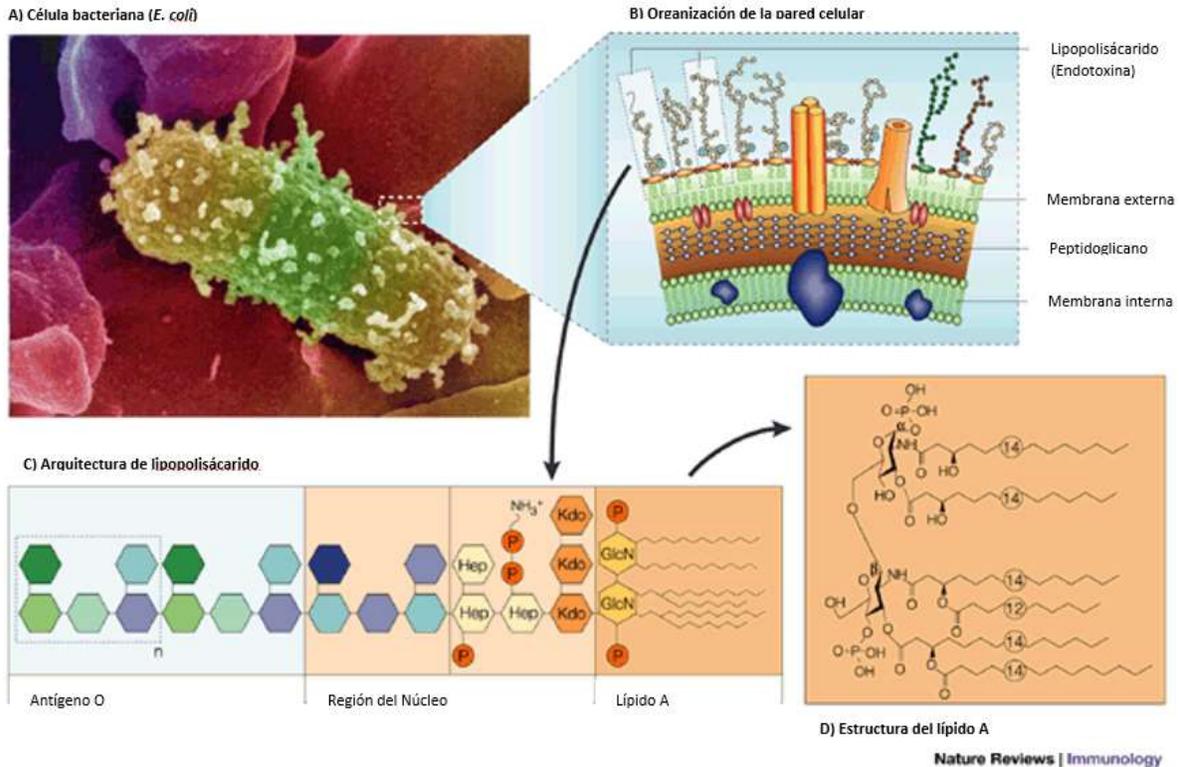


Figura 2. Origen y estructura de los LPS. A) Micrografía de una bacteria Gram negativa, en este caso *E. coli*. Este grupo de bacterias carecen de una pared celular de peptidoglicano, que es remplazada por una doble membrana lipídica B) Esquema representativo de la estructura de la doble membrana lipídica de las bacterias Gram negativas. El LPS es el principal componente de la hemicapa extracelular de la membrana. C) Esquema de una molécula de LPS. En este diagrama se muestran las regiones que componen a los LPS: el antígeno O, la región del núcleo y el lípido A. D) Representación esquemática del lípido A, la región más conservada en los LPS. Esta región está formada por un disacárido de N-Acetilglucosamina, este dímero puede presentar hasta seis cadenas de ácidos grasos unidos mediante enlaces éster. (Beutler et al. 2003)

La región del núcleo es una zona intermedia localizada entre la zona del antígeno O y el lípido A. Esta región tiene un grado de conservación intermedia. La característica más destacable de esta región es la presencia de azúcares particulares como lo son el ácido-ceto-desoxi-octuglucosídico y heptosas; estos azúcares también suelen presentar una carga neta negativa debido a la presencia de fosfatos y carboxilatos unidos a los grupos hidroxilo de los azúcares.

La región del antígeno O es la región más externa de los LPS, además de ser la región que presenta mayor variabilidad en los LPS de distintas bacterias. Esta zona de los LPS está constituida por unidades repetidas de oligosacáridos. Las unidades repetidas presentan un número variable por cada LPS y puede haber de 1 a 8 unidades repetidas en una misma molécula de LPS. Al igual que en el lípido A y la región del núcleo, en el antígeno O pueden existir fosfatos y carboxilatos que contribuyen a la carga negativa global de los LPS. Además, en el antígeno O las unidades repetidas presentan una mayor variedad de grupos funcionales, y esta diversidad está relacionada con funciones particulares en la membrana externa, la cual sirve de reserva de algunas biomoléculas y también está involucrada en la evasión del sistema inmune por parte del microorganismo (Pastelin-Palacios et al., 2011).

2.3. Proteínas y Péptidos de defensa del hospedero

Para la sobrevivencia de un organismo multicelular es necesario que este tenga la capacidad de combatir la invasión por parte de microorganismos patógenos. Uno de los principales elementos que han desarrollado muchos organismos para poder combatir las infecciones está basado en la producción moléculas capaces de unirse a los organismos patógenos para eliminarlos o neutralizarlos. Dentro de estas moléculas destacan las proteínas con funciones antimicrobianas y los Péptidos de Defensa del Hospedero (HDP, del inglés *Host Defense Peptides*), también conocidos como Péptidos Antimicrobianos. Estas moléculas están constituidas por una gran cantidad de integrantes, cuya variabilidad estructural y funcional es muy elevada. Lo cual se asocia a la propiedad de estas moléculas de actuar a través del reconocimiento de PAMPS en los microorganismos, sin que existan mecanismos que le permitan generar adaptabilidad ante los agentes patógenos. A pesar de esta limitada capacidad de reconocimiento de PAMPS, las proteínas antibacterianas y los HDP son un componente esencial de la inmunidad innata y tienen un papel crítico en el combate a las infecciones en estadios tempranos. Además de ser necesarios durante el desarrollo de la respuesta del hospedero y participar en la activación del sistema inmune adaptativo (Levy, 2000; Hancock et al., 2016).

En el humano y otros mamíferos, la Proteína Incrementadora de la Permeabilidad-Bactericida (BPI, del inglés *Bactericidal/permeability-increasing protein*) y la Proteína de Unión a LPS (LBP) son dos de las principales proteínas antimicrobianas involucradas en la defensa a infecciones bacterianas, principalmente de aquellas producidas por bacterias Gram negativas. Estas proteínas ejercen acciones sinérgicas, complementarias y antagónicas para la resolución de una infección (Bingle & Craven, 2004). LBP es una proteína que se sintetiza en el hígado y es liberada constitutivamente a la circulación general, a pesar de esto, LBP también actúa como una proteína de fase aguda por lo que su producción y liberación aumentan en los estadios tempranos de una infección. A diferencia de LBP, la proteína BPI se produce de forma exclusiva en neutrófilos, en donde se almacena en los gránulos azurófilos. La liberación de BPI de los gránulos, requiere la

activación de vías de señalización que favorecen la exocitosis de los gránulos azurófilos de los neutrófilos (Beamer et al., 2008; Krasity et al., 2011).

Durante una infección LBP es la primera proteína que interactúa con el microorganismo patógeno. A pesar de que LBP carece de propiedades líticas ante las bacterias, es necesaria la interacción de LBP con los LPS en la activación de los receptores TLR4 para favorecer el desarrollo de la respuesta pro-inflamatoria inicial (Lu et al., 2008). La liberación de moléculas pro-inflamatorias promueve la activación de células del sistema inmune innato, como lo son los neutrófilos. La activación de los neutrófilos conduce a la liberación del contenido de gránulos contenidos en estas células. Este evento produce la liberación de la proteína BPI. A diferencia de LPB, BPI posee capacidad bactericida ante distintos microorganismos como resultado de su capacidad de unión a los LPS para promover la desestabilización de la membrana externa bacteriana e inducir la lisis bacteriana. Además, BPI se une con una alta afinidad a fragmentos de membranas bacterianas que son liberados a la circulación. Esta unión con BPI evita que estos fragmentos puedan interactuar con LBP por lo que disminuye la activación de los mecanismos pro-inflamatorios que dependen de la formación de los complejos LBP-LPS (Dentener et al., 1993; Gutschmann et al., 2001; Weiss, 2003).

Los HDP son un grupo de péptidos de constitución altamente heterogénea que presentan características bastante particulares. Estos péptidos tienen una longitud de hasta 45 aminoácidos con presencia de hasta un 50% de aminoácidos hidrofóbicos. Además, la gran mayoría de estos péptidos presentan una carga neta positiva, asociada a la presencia de aminoácidos catiónicos como lisina y arginina. La estructura de estas moléculas también presenta una alta variabilidad, la cual se asocia a la capacidad de los HDP para ejercer sus funciones a través de diversos mecanismos moleculares. Los HDP están presentes en prácticamente todos los organismos multicelulares y actualmente se conocen más de 2500 de estos péptidos (Zhang & Gallo, 2016).

Los HDP participan en el combate a infecciones producidas por diferentes microorganismos, pero son de especial importancia durante las infecciones

bacterianas. Debido a su carácter catiónico, una gran cantidad de HDP también puede unirse a LPS, y al igual que las proteínas de unión a LPS pueden participar como agentes bactericidas o bacteriostáticos.

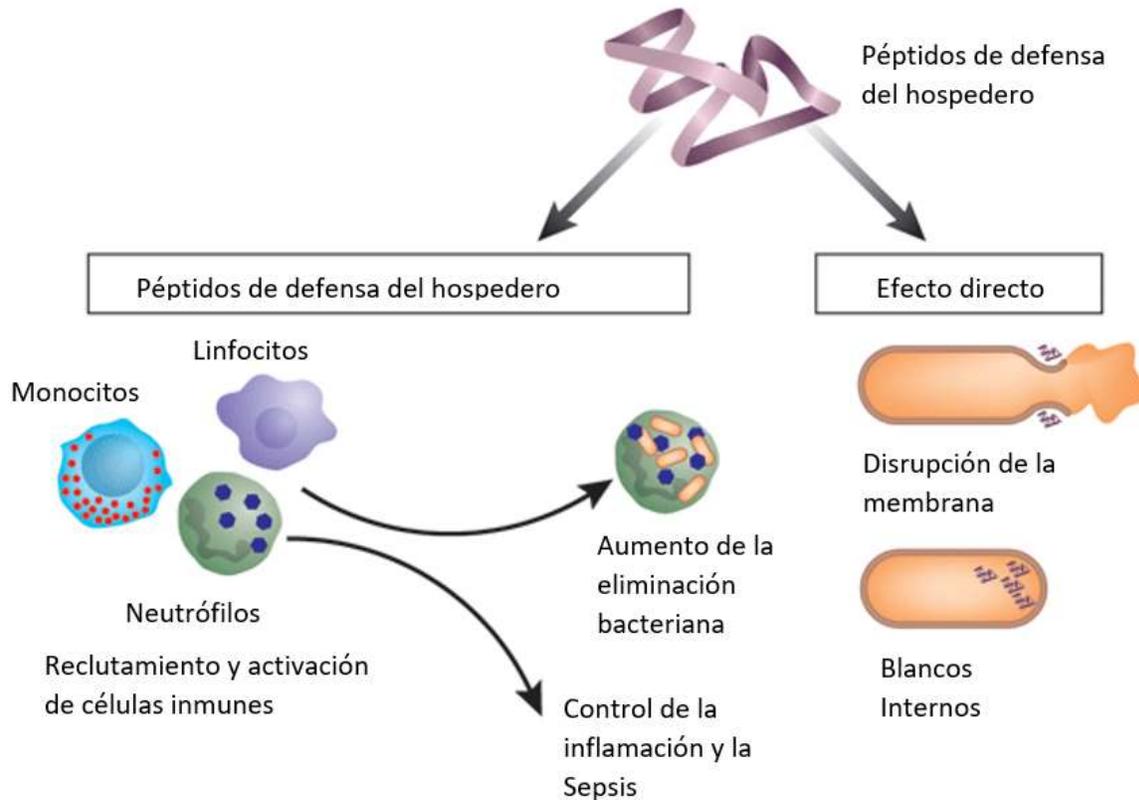


Figura 3. Mecanismos de acción de los HDP. Los HDP participan de distintas formas durante una infección, algunos de estos péptidos tienen acción bactericida la cual pueden ejercer al inducir la lisis de la bacteria mediante la perturbación de la estructura de la membrana o al unirse a blancos intracelulares en las bacterias. Otros HDP carecen de actividad bactericida, sin embargo, pueden participar en mecanismos que favorecen la eliminación del patógeno o que regulan el desarrollo del proceso inflamatorio. (Hancock 2006)

Los HDP ejercen sus efectos de diversas maneras, incluyendo la acción bactericida directa o mediante mecanismos no asociados a propiedades bactericidas (Figura 3). El efecto bactericida de los HDP suele estar mediado por su capacidad de interactuar con la membrana bacteriana promoviendo la desestabilización y cambios en la permeabilidad de la membrana bacteriana. Por otro lado, algunos HDP pueden atravesar las membranas bacterianas e introducirse en las bacterias donde ejercen su efecto bactericida por mecanismos que no involucran la

desestabilización directa de las membranas bacterianas. Otra de las acciones más importantes que ejercen los HDP es la regulación de la respuesta inmune, esto se debe a la capacidad de los HDP de interferir con el sistema de reconocimiento de LPS para limitar la respuesta del hospedero (Hancock & Lehrer, 1998; Scott et al., 2000; Hilchie et al., 2013).

Las propiedades bactericidas e inmunoreguladoras de los HDP y las proteínas de unión a LPS han hecho que en los últimos años se concentren esfuerzos en plantear nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas basadas en el uso de estas moléculas. (Hancock & Sahl, 2006; Wimley & Hristova, 2011).

2.4. CETP, CETPI y el péptido VSAK

La Proteína Transferidora de Esteres de Colesterol (CETP, del inglés *Cholesteryl Ester Transfer Protein*) es una proteína plasmática involucrada en la transferencia de triacilgliceroles y esteres de colesterol entre lipoproteínas. CETP tiene un papel crítico en la homeostasis del metabolismo del colesterol al ser la principal responsable del transporte reverso de colesterol. CETP es uno de los cuatro miembros incluidos dentro de la familia de proteínas de transferencia de lípidos o de unión a LPS. Los otros tres miembros que integran esta familia son: la Proteína de Transferencia de Fosfolípidos (PLTP, del inglés *Phospholipid Transfer Protein*), LBP y BPI (Beamer et al., 1997; Eckert et al., 2013; Qiu et al., 2007) (Figura 4).

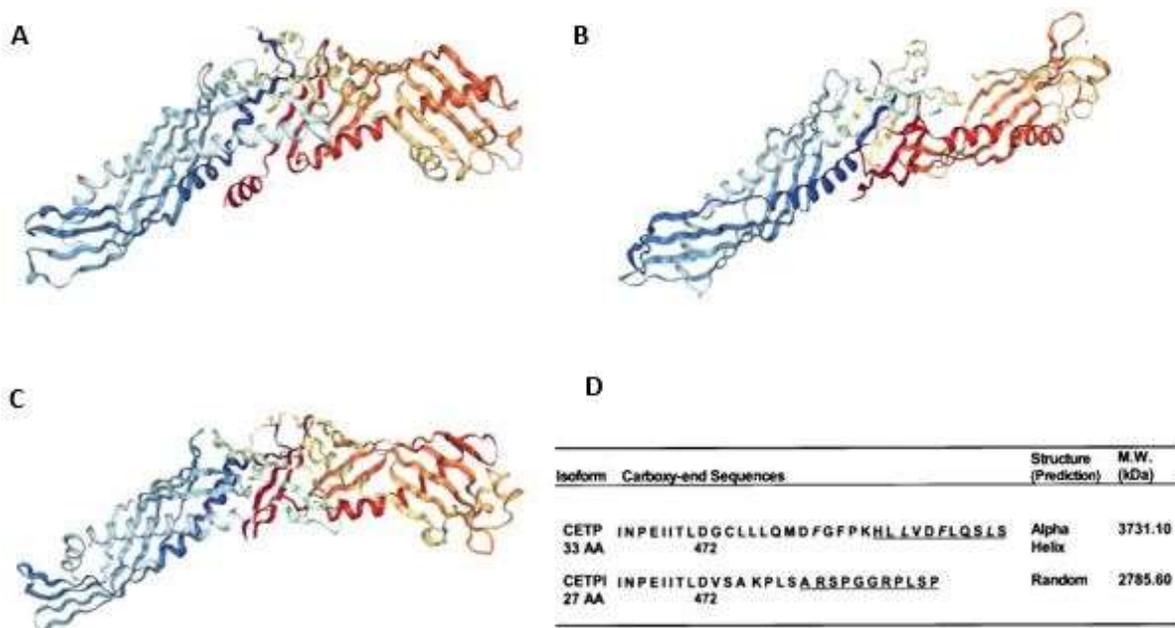


Figura 4. Estructura de las proteínas CETP, LBP y BPI. A) Estructura cristalográfica de CETP, B) Estructura cristalográfica de LBP, C) Estructura cristalográfica de BPI. A pesar de que la conservación de la estructura primaria entre esta familia de proteínas es relativamente baja, todas presentan una estructura secundaria y terciaria muy conservada la cual se asocia con su capacidad de interactuar con estructuras lipídicas. D) Secuencia del carboxilo terminal de CETP y secuencia del carboxilo terminal previsto para CETPI, en CETPI esta región estaría desorganizada y presentaría una carga neta positiva. La secuencia prevista para CETPI es la misma secuencia que se utilizó para sintetizar el péptido VSAK. (Beamer et al., 1997; Eckert et al., 2013; Qiu et al., 2007)

En su conjunto las proteínas de Transferencia de Lípidos-Unión a Lipopolisácaridos, forman parte de una familia de proteínas conocidas como Proteínas con motivos de BPI/PLUNC (por las siglas *Palate, Lung, Nasal-epithelium Clone-Protein*). Las proteínas PLUNC están involucradas en los sistemas de defensa de las vías aéreas y el paladar (Bingle & Craven, 2002; Ghafouri et al.2004).

Hasta hace algunos años solo se había reportado la existencia de una variante de CETP. Esta variante corresponde a una forma trunca que carece de los aminoácidos codificados a partir del exón 9. Esta variante de CETP no presenta actividad de transferencia de lípidos, aunque se presume que puede actuar como un modulador indirecto de la actividad de CETP (Drayna et al., 1987).

La investigación que se ha realizado en nuestro laboratorio durante muchos años sobre CETP condujo al hallazgo de una nueva variante de esta proteína llamada Isoforma de la Proteína de Transferencia de Esteres de Colesterol (CETPI). Esta proteína se expresa de forma exclusiva de intestino delgado. Además de que es posible detectar un nivel importante de CETPI en la circulación general, la cual se observó tanto en humanos como de conejos. CETPI comparte un grado de conservación estructural muy alto con respecto a CETP, este alto grado de similitud se explica al comparar los RNA mensajeros (mRNA) que dan origen a ambas proteínas. El mRNA de CETPI es idéntico al de CETP hasta el nucleótido en la posición 1419 en donde ocurre la inserción de una secuencia de 108 nucleótidos, esta secuencia corresponde con una región que se encuentra presente en el intrón localizado entre los exones 15 y 16 de CETP. En esta secuencia de 108 nucleótidos, originalmente nombrada secuencia I (Figura 5), están presentes dos codones de paro: el primero en la posición 55 y el segundo localizado en la posición 106. Debido a la presencia de estos codones de paro, CETPI pierde los últimos 23 aminoácidos de la parte final del extremo carboxilo terminal, los cuales son reemplazados por los residuos codificados en los primeros 54 nucleótidos de la secuencia I. Dado este evento, la estructura primaria de aminoácidos de CETP y CETPI conserva un grado de homología muy elevado, cercano al 98%. La única diferencia entre estas

proteínas reside en los últimos aminoácidos del extremo carboxilo terminal, a partir de un residuo de ácido aspártico en la posición 472 (Alonso et al., 2003;).

A pesar de esta diferencia mínima entre CETP y CETPI, la región en la que difieren estas proteínas tiene un papel crítico en las funciones que llevan a cabo. En CETP, los últimos 23 aminoácidos de la región carboxilo terminal forman una alfa hélice de carácter antipático la cual está involucrada en el transporte de lípidos y esteres de colesterol (García-González & Mas-Oliva, 2013).

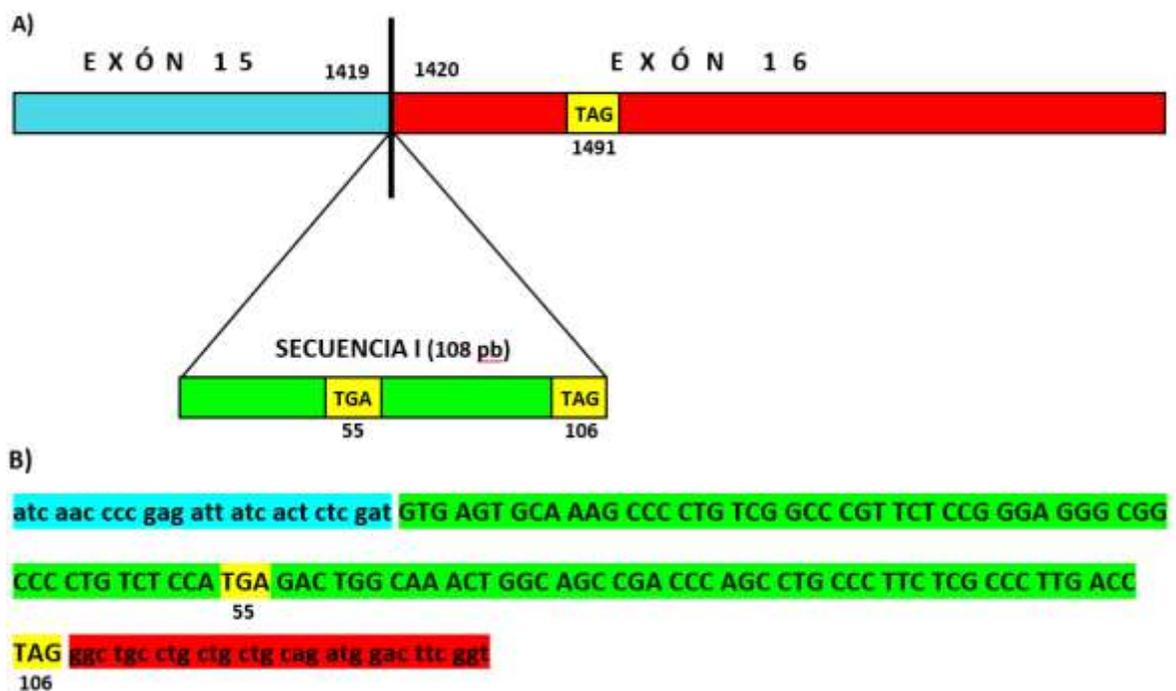


Figura 5. La Secuencia I de CETPI. A) Representación esquemática de la región límite entre los exones 15 (azul) y 16 (rojo) del mRNA de CETP. Entre las bases 1419 y 1420 ocurre la inserción de la secuencia I (verde) que da origen al mRNA de CETPI. Las regiones codones de paro se muestran con recuadros amarillos. **B)** secuencia de la región terminal del mRNA de CETPI. El esquema muestra los tripletes presentes en la secuencia I, la presencia de un codón de paro en la posición 55 de la secuencia I explica la pérdida de la región carboxilo terminal en CETPI y su sustitución por los aminoácidos codificados por las primeras 54 bases de la secuencia I. Modificado de Alonso et al., 2003

Al carecer de esta región, CETPI es incapaz de realizar la transferencia de lípidos y esteres de colesterol. En contraste, la región carboxilo terminal de CETPI estaría constituida por una secuencia desestructurada, con un alto contenido de prolinas,

que además presentaría una carga neta positiva. Sin embargo, debido a las características de la región carboxilo terminal de CETPI se prevé que esta proteína podría presentar capacidad de unión a lípidos con carga negativa, como lo son algunos lípidos bacterianos. Las propiedades de interacción con lípidos del carboxilo terminal de CETPI se estudiaron mediante la utilización de péptidos sintéticos correspondientes al carboxilo terminal de esta proteína.

A)

V S A K P L S A R S P G G R P L S P

B)

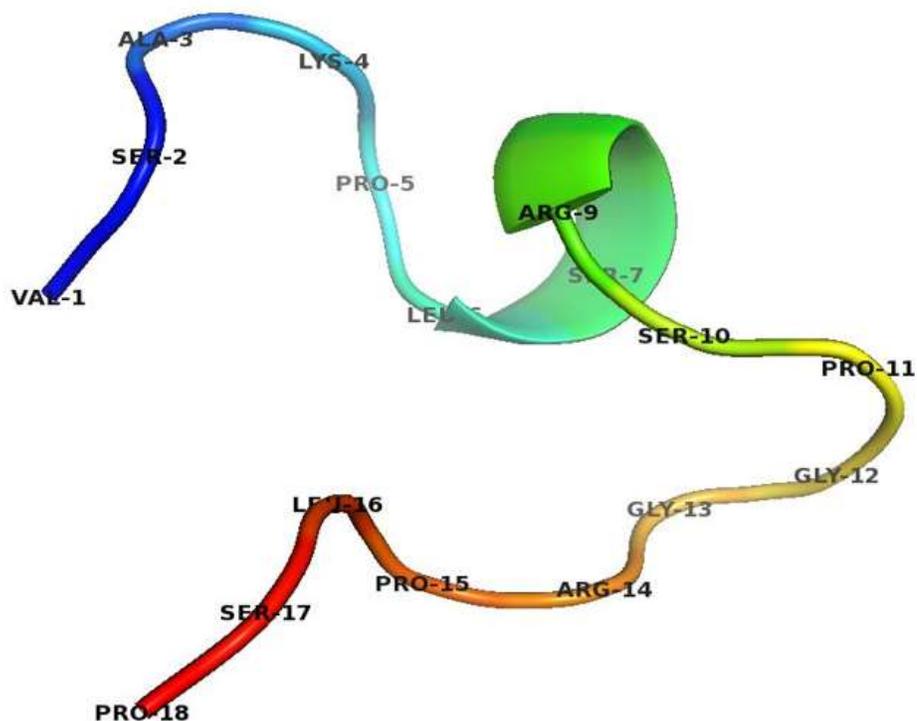


Figura 6. El péptido VSAK. A) Secuencia primaria del péptido VSAK los residuos hidrofóbicos están presentes en verde, en negro se presentan los residuos polares y en azul los aminoácidos con carga positiva. Este péptido fue sintetizado a partir del carboxilo terminal de CETPI. El péptido VSAK tiene una longitud de 18 aminoácidos con un carácter anfipático. **B)** Modelo representativo del péptido VSAK. Este péptido carece de una estructura definida manteniéndose desordenado en solución. A pesar de la presencia de residuos hidrofóbicos (44%), este péptido mantiene su solubilidad en agua. El modelo fue generado con utilizando PEP-FOLD 3 (Shen et al., 2014).

En estos experimentos se observó que el péptido VSAK, un péptido derivado del carboxilo terminal que tiene una longitud de 18 aminoácidos (Figura 6), presenta una alta capacidad de unión a LPS. Este péptido presenta una interacción muy estable con los LPS, la cual tiene un carácter electroestático.

Además, a través de diversos estudios *in vitro* se observó que la interacción que existe entre VSAK y los LPS es capaz de neutralizar la toxicidad inducida *in vitro* por los LPS. También, en nuestro laboratorio se han realizado pruebas de la administración de LPS en un modelo *in vivo*; para ello se utilizaron conejos Nueva Zelanda los cuales fueron tratados LPS por vía intravenosa para inducir un estado similar al choque séptico. La administración de LPS en estos animales produjo un estado similar al choque séptico, en el que presentaron diversos signos característicos de este estado, así como un aumento en el nivel de citocinas pro-inflamatorias en circulación. La administración del péptido VSAK en este modelo evitó que se produjeran los cambios asociados al desarrollo del estado de choque séptico (García-González et al., 2015).

Estos experimentos aportaron información muy importante del papel que puede tener el péptido VSAK como un nuevo péptido con propiedades de unión y neutralización de LPS (PCT/MX2014/000087 ; WO2015190903A1, 2014). Sin embargo, aún quedan aspectos que se deben explorar para dilucidar el mecanismo de acción de VSAK, así como las propiedades de interacción de este péptido con los LPS. Estos son factores críticos para poder plantear la posible aplicación del péptido VSAK como agente terapéutico para estados de sepsis y choque séptico.

2.5. Panorama actual sobre la sepsis y choque séptico

Dada la importancia de la sepsis y el choque séptico como uno de los principales problemas de salud pública en estos días, actualmente es necesario plantear nuevas estrategias para el diagnóstico, tratamiento y prevención de estas condiciones (Jonathan Cohen et al., 2015).

Esta necesidad de plantear nuevas estrategias también ha conducido a un cambio en la forma en la que se realiza la investigación de estas condiciones. En los últimos años ha surgido la necesidad de generar sistemas que aporten información más cercana a lo que ocurre durante un proceso de sepsis y choque séptico. Estos cambios se ven reflejados, por ejemplo, en la necesidad de generar modelos que reproduzcan de forma más certera las condiciones de sepsis y choque séptico. Además, es necesario buscar que estos modelos guarden una mayor similitud con la forma en que desarrollan estas patologías en el humano (Lilley et al., 2015).

Otro de los cambios relevantes en el estudio de la sepsis y el choque séptico, ha sido la incorporación de nuevas técnicas que permitan un mejor estudio de los distintos eventos que se producen durante estos procesos. Un ejemplo de ello es la incorporación de técnicas de imagen funcional como método de apoyo para el estudio de procesos de sepsis y choque séptico. Uno de los casos más destacables es el uso de la Tomografía de Emisión de Positrones (PET, por las siglas *Positron Emmision Tomography*). Esta metodología presenta grandes beneficios que pueden ser aplicados para el seguimiento de procesos de sepsis y choque séptico. Por un lado, estos sistemas presentan una opción de estudio no invasiva y altamente sensible que permite monitorear procesos metabólicos en tiempo real (Kluge et al., 2012). La otra gran ventaja de este sistema reside en la versatilidad de los radiomarcadores que pueden ser utilizados para estos estudios. A pesar de que el uso del PET se ha enfocado principalmente en el campo diagnóstico, el uso de esta técnica como un sistema para el seguimiento de los eventos asociados a la sepsis y el choque séptico es un campo con posibilidades prometedoras.

3. Planteamiento del problema

Actualmente la mortalidad relacionada a procesos infecciosos sigue siendo una de las principales causas de decesos a nivel mundial. Para la gran mayoría de los casos, la mortalidad de la infección está asociado con el desarrollo de sepsis y choque séptico. A pesar de las diferencias que existen entre estas condiciones, el factor común para ambas es la presencia de la infección en el organismo huésped que produce una activación sistémica la cual compromete las funciones normales del individuo, y por lo tanto pone en riesgo la vida de este.

La sepsis y el choque séptico toman especial relevancia sobre individuos en las cuales el funcionamiento del sistema inmune está comprometido. Lo cual explica la alta incidencia de estas patologías en neonatos, individuos con quemaduras o traumas severos, así como personas inmunosuprimidas como es el caso de personas con VIH/SIDA o bajo regímenes de tratamiento oncológico. Muchas de estas condiciones se ajustan a pacientes de unidades de cuidados intensivos, lo cual explica porque la sepsis y el choque séptico representan una de las principales causas de muerte en estas unidades.

A pesar de que la sepsis y el choque séptico pueden desarrollarse a partir de cualquier tipo de infección (viral, bacteriana, fúngica o parasitaria), las infecciones bacterianas son las presentan mayor prevalencia para el desarrollo de sepsis y choque séptico. Este último asociado a factores como la creciente resistencia microbiana a los antibióticos, la cual dificulta la eliminación eficiente de los patógenos. En adición, estos microorganismos presentan moléculas con un alto potencial inmunógeno, como es el caso de los principales componentes de las membranas bacterianas, el LPS de las bacterias Gram negativas y el peptidoglicano de las bacterias Gram positivas.

Una de las estrategias más prometedoras para el tratamiento de sepsis y choque séptico, es la administración de agentes neutralizadores de las moléculas inmunógenas del patógeno, las cuales puedan ser administradas en conjunto con el tratamiento con antibióticos. En esta estrategia se busca generar moléculas que permitan regular la forma en que se desarrolla la respuesta inmune del hospedero,

sin llegar a frenar por completo este proceso y así evitar que se produzca un estado de inmunosupresión.

En un estudio previo de nuestro laboratorio, se demostró que la administración del péptido VSAK es capaz de evitar la aparición de signos asociados al desarrollo de choque séptico por administración intravenosa de LPS. Además, en animales administrados con LPS el tratamiento con el péptido VSAK disminuyó de forma importante el nivel en circulación de TNF α , una de las principales citocinas producidas durante la sepsis y asociada con el desarrollo de choque séptico.

En este proyecto buscamos ampliar el panorama de la aplicación del péptido VSAK como un agente con capacidad de neutralizar el efecto producido por LPS en un modelo animal que reproduce un estado similar al choque séptico. En nuestros estudios aprovechamos el uso del PET para realizar el monitoreo del desarrollo del estado de choque séptico en los animales. Esta técnica nos permitió realizar un seguimiento en tiempo real de este proceso en animales bajo distintos tratamientos, además de permitirnos recuperar al final de los ensayos muestras integrales de estos animales para los análisis adicionales.

4. Hipótesis

La administración del péptido VSAK en un modelo *in vivo* de choque séptico atenuará los efectos producidos por los LPS.

5. Objetivo general

Demostrar que el péptido VSAK tiene un efecto neutralizador de LPS en un modelo animal de choque séptico.

6. Objetivos específicos

Determinar mediante PET los perfiles de captación del radiotrazador en los distintos grupos experimentales.

Caracterizar mediante PET el desarrollo de los efectos producidos de la administración de LPS en comparación con los animales que son administrados con VSAK y LPS

Analizar los cambios en el perfil de moléculas pro-inflamatorias en los animales inducidos a choque séptico, así como en los animales tratados con VSAK y LPS.

Analizar cambios en el nivel de Insulina y glucosa durante la condición de choque y en comparación con los animales tratados con el péptido VSAK, y determinar la relación con los cambios observados en el consumo de 18FDG

7. Materiales y métodos

7.1. Péptido VSAK

El péptido VSAK utilizado en nuestros experimentos fue sintetizado por la empresa Genscript (Piscataway, NJ) contando con un certificado de pureza mayor al 98%. El péptido VSAK tiene una longitud de 18 aminoácidos que corresponden a la región C-terminal comprendida entre V474-P491 (V S A K P L S A R S P G G R P L S P) de CETPI de conejo (García-González et al., 2015). Para la administración del péptido en animales utilizados en los estudios de microPET se empleó una solución de trabajo con una concentración de 1mg/ml del VSAK suspendido en buffer salino de fosfatos.

7.2. Lipopolisacáridos

En nuestros experimentos se utilizaron LPS de la variante O111:B4 los cuales son obtenidos de una cepa de *Escherichia coli* y distribuidos comercialmente por Sigma-Aldrich. La cantidad de unidades de endotoxina presentes en esta variante de LPS fue cuantificada utilizando el sistema Endosafe (Charles River, Wilmington, MA). La cuantificación determinó que existían 798 EU por nanogramo en los LPS utilizados en nuestros experimentos.

Los LPS utilizados en los experimentos fueron resuspendidos en un buffer Krebs-Ringer sin glucosa. Antes de ser resuspendidos los LPS se homogenizaron disolviéndolos en H₂O_{dd} con una concentración inicial de 1ug/ml. Esta solución se agito en un vortex hasta disolver los agregados de LPS. Después se calentó a 60 °C durante 10 minutos y de forma posterior se realizaron tres ciclos de sonicación de 5 minutos utilizando un sonicador de baño. Al término de la sonicación la solución se agito vigorosamente en un vortex por dos minutos para asegurar la resuspensión completa de los LPS. Finalmente, para la preparación de la solución de trabajo los LPS se diluyeron a una concentración final de 10 ng/ml en buffer Krebs-Ringer

7.3. Animales

Para los experimentos de microPET y de análisis de marcadores inflamatorios se utilizaron conejos enanos holandeses mestizos obtenidos de una granja local, que por sus características de talla son idóneos para su uso en el microPET.

Antes de ser utilizados en los experimentos de microPET, los animales pasaron por un periodo de adaptación en el cual se mantuvieron en el bioterio del instituto con condiciones controladas de temperatura, humedad y de ciclos de luz-oscuridad. Durante este periodo los animales contaron con agua y alimento *ad libitum*.

Todos los experimentos de MicroPET fueron realizados con los animales en estado de sedación. El anestésico utilizado fue isoflurano (1-3%) administrado junto oxígeno. La inducción de la anestesia se realizó en una cámara cerrada con un 5% de isoflurano. Durante los experimentos, la anestesia fue mantenida con la ayuda de una mascarilla, la cantidad de anestésico se ajustó en base a la frecuencia respiratoria de los animales.

El uso de los animales, la administración de tratamientos, uso de anestésicos y métodos de sacrificio fueron evaluados y aprobados por el Comité Interno para Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular (CICUAL) bajo el folio de proyecto JMO117-17.

7.4. Equipo de microPET

Los experimentos de microPET se realizaron en la unidad de PET-CT, de la Facultad de Medicina, UNAM. Se utilizó el equipo de MicroPET de cuarta generación FOCUS 120 (Concorde Microsystems, Knoxville, TN) distribuido por SIEMENS. Este equipo cuenta con un anillo de detección de 15 cm de diámetro con 96 detectores. Los detectores están formados por un arreglo de 12x12 cristales de Oxi-ortosilicato de Lutecio acoplados a un sistema fotomultiplicador. El equipo tiene una apertura de 12 cm de diámetro para la colocación de los animales de experimentación, el cual da lugar a un campo de visión de 7.6 cm en dirección axial y 10 cm en dirección transaxial.

El equipo de microPET está acoplado con un sistema que permitió monitorear la temperatura rectal de los animales, el cual además cuenta con una sábana térmica que se utilizó para mantener estable la temperatura de los animales durante el curso de los experimentos.

En nuestros experimentos utilizamos ¹⁸F-FDG (2-[¹⁸F]Fluoro-2-Desoxi-D-Glucosa) como radiotrazador, esta molécula presenta el positrón en el segundo carbono del anillo del azúcar. Esta molécula es un análogo de la glucosa que puede ser captada por los transportadores de glucosa, pero no metabolizada en la vía glicolítica. Una vez que esta molécula es captada el positrón del flúor interactúa con electrones del medio para producir el evento de aniquilación, esto conlleva la emisión de dos fotones de alta energía con trayectorias opuestas.

El equipo de microPET puede captar estos fotones a través del anillo de fotodetectores, los datos de los fotones son utilizados por el sistema para reconstruir la trayectoria al sitio de emisión. La información de estas trayectorias es utilizada para generar los datos de captación del organismo analizado.

7.5. Estudio de microPET - LPS 300ng/kg

Para el primer experimento de microPET se utilizaron 10 conejos enanos. Estos animales pertenecían a la misma camada, con lo que buscamos disminuir la variación entre los individuos. Los conejos fueron recibidos con una edad de 45 días, estos se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular durante 15 días hasta alcanzar una edad promedio de 60 días.

Para realizar los estudios los animales se mantuvieron en ayuno las 12 horas previas al experimento. Para calcular la dosis administrada a los animales, estos fueron pesados durante el día del experimento una vez que se cumplió el periodo de ayuno establecido.

Los conejos se asignaron aleatoriamente a alguno de los cuatro grupos siguientes:

1. Grupo CONTROL. Fue administrado con Solución salina (2 conejos)
2. Grupo VSAK. Fue administrado con el péptido VSAK (60 ug/kg) (2 conejos)
3. Grupo LPS. Fue administrado con LPS (300 ng/kg) (3 conejos)
4. Grupo VSAK/LPS. Fue administrado con péptido VSAK (60 ug/kg) y LPS (300 ng/kg) (3 conejos)

La administración de los tratamientos se realizó a través de las venas marginales en las orejas de los animales. La dosis para los distintos tratamientos fue estimada con base al peso del animal por vía intravenosa utilizando las venas marginales de las orejas de los animales. Los LPS se administraron en solución Krebs-Ringer (pH 8) con un volumen total de 300 ul. Mientras que el péptido VSAK fue administrado en buffer salino de Fosfatos (pH 7.4) en un volumen de 300ul. A los conejos del grupo control se les administró 300 ul de solución Krebs-Ringer.

En este experimento se buscó obtener datos de captación dinámica del radiofármaco en la zona torácico-abdominal de los animales de experimentación en los 70 minutos posteriores a la administración de LPS en los grupos 3 y 4 o su equivalente en el grupo 1 y 2.

Al término de cada experimento se sacrificó al animal con una sobredosis de anestésico (pentobarbital). Se recolectó sangre de los animales mediante punción cardiaca para la obtención de suero y plasma. Además, se extrajeron muestras de tejido de hígado, intestino delgado, colon y estómago las cuales se congelaron en nitrógeno líquido para su conservación y análisis

En la tabla 1 se presentan los datos de los animales utilizados en este experimento, incluyendo su peso, grupo experimental y dosis administradas. También se presenta un esquema que resume el proceso de administración de los tratamientos para los animales de los diferentes grupos experimentales

La administración de los tratamientos se realizó según el siguiente esquema:

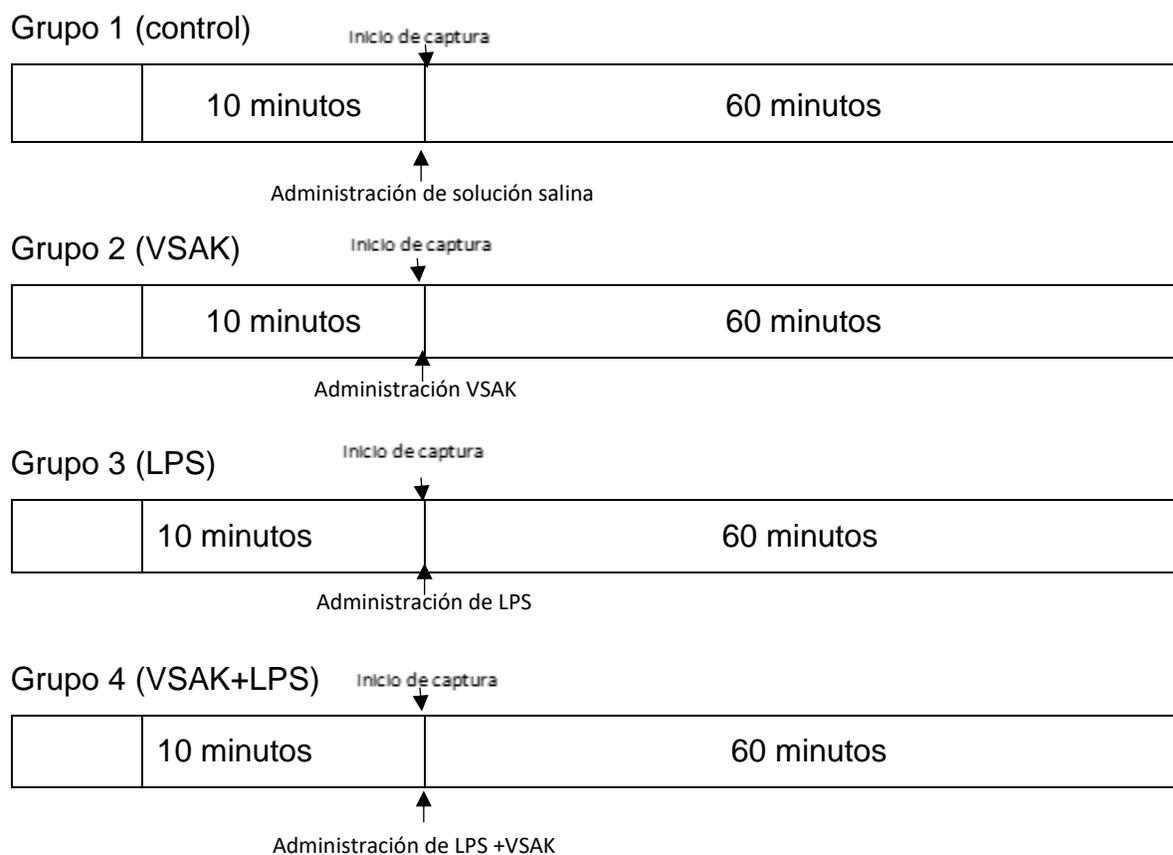


Tabla 1. Animales experimento 300ng/Kg

Numero de animal	Tratamiento	Peso (g)	Dosis LPS (ng)	Dosis VSAK (ug)
C3	VSAK	972	-	58.32
C4	VSAK+LPS	1063	318.9	63.78
C5	CONTROL	1080	-	-
C6	LPS	950	285	-
C7	VSAK	900	-	54
C8	VSAK+LPS	1175	352.5	70.5
C9	LPS	840	252	-
C10	CONTROL	915	-	-
C11	VSAK+LPS	947	284.1	56.82
C12	LPS	1141	342.3	68.46

7.6. Estudio de microPET - LPS 450ng/Kg

En este protocolo se utilizaron 14 conejos enanos machos, los conejos fueron obtenidos de una granja local con una edad de 35 días. A la llegada de los animales se realizó una evaluación de su estado de salud y la desparasitación de los mismos. Los conejos se mantuvieron por un periodo de 15 días, bajo condiciones controladas en el bioterio del instituto.

Los animales se mantuvieron en ayuno las 12 horas anteriores a realizar los experimentos de microPET.

Los conejos fueron asignados aleatoriamente a alguno de los cuatro grupos siguientes:

1. Grupo CONTROL. Fue administrado con Solución Krebs-Ringer (3 animales)
2. Grupo VSAK. Fue administrado con el péptido VSAK (60 ug/kg) (3 animales)
3. Grupo LPS. Fue administrado con LPS (450 ng/kg) (4 animales)
4. Grupo VSAK+LPS. Fue administrado con péptido VSAK (60 ug/kg) y LPS (450 ng/kg) (4 animales)

La estimación para la administración de los distintos tratamientos se realizó con base al peso del animal. Los LPS se administraron en solución Krebs-Ringer (pH 8) con un volumen total de 300 ul. El péptido VSAK se administró en buffer salino de Fosfatos (pH 7.4) a un volumen final de 300ul. Los conejos del grupo control también fueron administrados con 300 ul de solución Krebs-Ringer. Todos los tratamientos se administraron a través de las venas marginales de las orejas de los animales y la administración del tratamiento se hizo algunos minutos antes de la administración del radiofármaco para inmediatamente proceder a la captura de PET. Para los grupos CONTROL, LPS y VSAK; la administración del tratamiento fue seguida por la administración inmediata del radiofármaco y se procedió a iniciar la captura. En el caso del grupo VSAK+LPS, primero se administraron los LPS y de forma casi simultánea se administró el péptido VSAK por la oreja contraria, finalmente se administró el radiofármaco para iniciar con la captura de PET. En este ensayo se obtuvieron datos de captura dinámica de microPET de la zona torácico-

abdominal de los animales de experimentación de los 90 minutos posteriores a la administración del radiofármaco.

La administración de los tratamientos se realizó según el siguiente esquema:

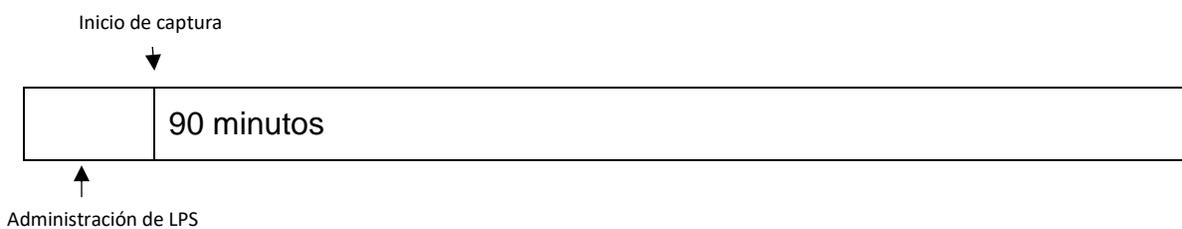
Grupo 1 (control)



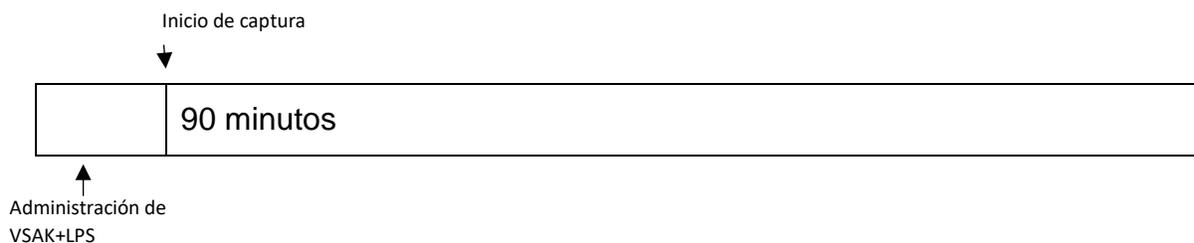
Grupo 2 (VSAK)



Grupo 3 (LPS)



Grupo 4 (LPS/VSAK)



Al término de cada experimento el conejo se sacrifico por sobredosis de anestésico (pentobarbital). Se recolecto sangre por punción cardiaca y se extrajeron el hígado, intestino delgado, colon y estomago de los animales. Los órganos extraídos fueron pesados y se usó una muestra de los tejidos para el análisis de la actividad específica al final de experimento, el resto del tejido fue congelado en nitrógeno líquido con el objetivo de preservarlos para el análisis posterior.

Tabla 2. Animales experimento LPS 450ng/kg

Numero de animal	Tratamiento	Peso (g)	Dosis LPS (ng)	Dosis VSAK (ug)
C1	VSAK	695	-	41.7
C2	VSAK	409	-	24.54
C3	LPS	633	284.85	-
C4	LPS	605	272.25	-
C5	CONTROL	532	-	-
C6	CONTROL	457	-	-
C7	VSAK+LPS	535	240.75	32.1
C8	VSAK+LPS	440	198	26.4
C9	VSAK+LPS	710	319.5	42.6
C10	VSAK	515	-	30.9
C11	CONTROL	557	-	-
C12	VSAK+LPS	501	225.45	30.06
C13	LPS	496	223.2	-

7.7 Proceso de adquisición

Los animales anestesiados se colocaron en el anillo de detección justo después de la administración de la 18FDG, la posición de los animales se ajustó para enfocar la región comprendida entre del ápice del corazón y la parte superior de la vejiga. Con este cuadrante se obtuvo información de la captura de 18FDG correspondiente a hígado, riñones y algunas regiones del intestino delgado. En ambos experimentos se realizaron capturas dinámicas de la región indicada.

En el experimento con la dosis de LPS de 300ng/kg, la captura duro 70 minutos a partir de la administración de la 18FDG. Al término del experimento se recuperó sangre de los animales anestesiados mediante punción cardiaca e inmediatamente fueron sacrificados mediante sobredosis de anestésico. Se recolectaron muestras de órganos y tejidos que fueron congeladas en nitrógeno líquido.

En el ensayo con una dosis de LPS de 450ng/kg, el tiempo de captura se extendió a 90 minutos a partir de la administración de 18FDG. Al término del experimento se recuperó sangre de los animales anestesiados mediante punción cardiaca e inmediatamente fueron sacrificados mediante sobredosis de anestésico. En estos animales se recuperaron muestras de tejidos en las cuales se analizó la actividad residual de la 18FDG para estimar el consumo específico por miligramo de tejido. Además, los órganos se pesaron antes de ser congelados para estimar el consumo específico total de los órganos.

Para los análisis posteriores se descartaron los datos obtenidos de animales con inconsistencias durante la captura o que murieron antes de finalizar el tiempo programado de captura.

7.8. Reconstrucción y análisis de datos de captura.

Todos los datos de captación obtenidos de los dos experimentos realizados fueron reconstruidos utilizando el algoritmo OSEM3D.

Los datos obtenidos del experimento con LPS 300 ng/kg se analizaron utilizando Volúmenes de Interés (VOI) esféricos con un diámetro de 5mm para obtener los datos de captación estándar (SUV) de intestino delgado e hígado. Los 70 minutos

de captura se dividieron en 5 bloques. El primer bloque de 10 minutos (0-10 minutos) y cuatro bloques de 15 minutos (10-25, 25-40, 40-55 y 55-70 minutos). Para la determinación del porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (%ID/g), se asumió una densidad de 1g/cm³ para todos los tejidos. Los datos de este experimento se normalizaron utilizando el valor de consumo del primer bloque para cada animal.

En el experimento con 450 ng/kg de LPS, los datos se analizaron utilizando VOI esféricos con un diámetro de 5mm para obtener los datos de captación estándar (SUV) de intestino delgado, hígado y riñones. Para la estimación del SUV en función del tiempo se analizaron los datos correspondientes a bloques de 30 segundos para cada animal. Los datos de captación total se obtuvieron a partir del consumo en los VOI durante los 90 minutos de captura en los órganos analizados. Para la determinación del porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (%ID/g), se asumió una densidad de 1g/cm³ para cada tejido.

7.9. Cuantificación de proteínas

Las cuantificaciones de proteínas en las muestras de plasma y suero se llevaron a cabo utilizando un kit comercial para cuantificación basado en el método de Lowry modificado (Biorad, Hercules, CA). Para la cuantificación las muestras de plasma o suero se diluyeron 1:100.

La medición de la absorbancia se realizó en microplacas de 96 pozos según las indicaciones del fabricante, utilizando un espectrofluorómetro Synergy HT (Biotek, Winooski, VT)

7.10. Medición de metabolitos plasmáticos

La cuantificación de metabolitos (glucosa e insulina) se realizó en un laboratorio de análisis clínicos comercial, AIMSA (CDMX, México). Este laboratorio cuenta con certificación para el análisis de los metabolitos de interés en muestras de origen animal incluyendo conejos.

Las mediciones se hicieron utilizando alícuotas del suero obtenido de los animales, este procedimiento se realizó para todas las muestras obtenidas de los distintos experimentos de MicroPET.

7.11. Medición citocinas proinflamatorias

La medición de citocinas en plasma se realizó utilizando el kit para detección de múltiples citocinas pro-inflamatorias Quantibody (Raybiotech, Norcross, GA, USA), este sistema permite la detección simultánea de IL-1A (Interleucina 1-Alfa), 1L-1B (Interleucina 1-Beta), Leptina, NCAM (Molécula de Adhesión Celular Neuronal, del inglés *Neural Cell Adhesion Molecule*), IL-8 (Interleucina-8), MIP-1B (Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1-beta, del inglés *Macrophage Inflammatory Protein*), MMP9 (Metaloproteasa de la Matriz 9, del inglés *Matrix metalloproteinase*) y TNF α (Factor de Necrosis Tumoral Alfa, del inglés Tumor Necrosis Factor Alpha). La medición se realizó directamente en el suero obtenido de los animales, siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura de placa se realizó utilizando un lector de microarreglos GenePix 4000B (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). La placa se leyó utilizando el canal Cy3 (verde) con una longitud de onda de excitación de 532nm.

La estimación de la concentración de las citocinas en plasma se realizó a mediante la extrapolación del valor de fluorescencia. Las curvas de concentración estándar también fueron generadas con los valores de fluorescencia media y ajustadas con ayuda del software Graphpad Prism (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

7.12. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Graphpad Prism (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). Para los análisis de los datos de SUV, %ID y temperatura entre los distintos grupos, se utilizaron ANOVA de dos vías. Los datos de insulina, glucosa y de las distintas citocinas medidas fueron analizadas utilizando ANOVA de una vía

8. Resultados

En este proyecto realizamos dos distintos experimentos de forma independiente. El primer experimento se realizó a partir de lo reportado previamente en conejos Nueva Zelanda, manteniendo la misma dosis de LPS (300 ng/Kg) utilizada en este estudio. La duración de la captura se estimó considerando la vida media del radiotrazador, buscando no exceder los 120 minutos de vida media de la 18FDG.

En el segundo experimento se realizaron ajustes sobre la dosis administrada y el tiempo de captura, con la finalidad de mejorar el efecto observado en los animales en choque séptico, y al mismo tiempo busco destacar el efecto de la administración de VSAK en esta condición.

Para cada experimento se realizó la cuantificación de insulina y glucosa, buscando una asociación con los cambios que se observaron utilizando el PET. Junto con la evaluación de moléculas pro-inflamatorias involucradas en el desarrollo de choque séptico.

8.1. Primer experimento - Modelo de choque séptico con LPS 300ng/kg

8.1.1. Análisis cualitativo

Los datos de captación fueron reconstruidos para generar imágenes y videos del consumo de 18-FDG en los animales. Para el análisis de los datos del consumo del radiofármaco, se dividió el tiempo total de captura en bloques temporales. Los setenta minutos de captura se dividieron en 5 bloques: un bloque de 10 minutos previo a la administración del tratamiento y 4 bloques de 15 minutos. Los bloques se utilizaron para comparar el consumo de 18FDG entre los grupos experimentales durante el tiempo de captura. Cabe resaltar, que la apreciación cualitativa en la diferencia de captación se percibe mejor en las imágenes del renderizado tridimensional en comparación con los cortes anatómicos (bidimensionales), debido a la mayor cantidad de datos que poseen las primeras.

En la Figura 7 se presentan imágenes representativas de animales de cada uno de los grupos, estas imágenes corresponden a la captación total y se generaron a partir del renderizado tridimensional. En esta figura se observa con el grupo VSAK tuvo

una captación de 18FDG similar a la del grupo CONTROL. Mientras que en grupo LPS se aprecia una disminución en la captación global de 18FDG. Además, en el caso de los animales a los que se les administro de forma simultánea el péptido VSAK y LPS no ocurrió esta disminución en la captación que se observó en los animales del grupo LPS, y se observó una distribución de captación similar a la que se observó en los animales del grupo CONTROL y del grupo VSAK.

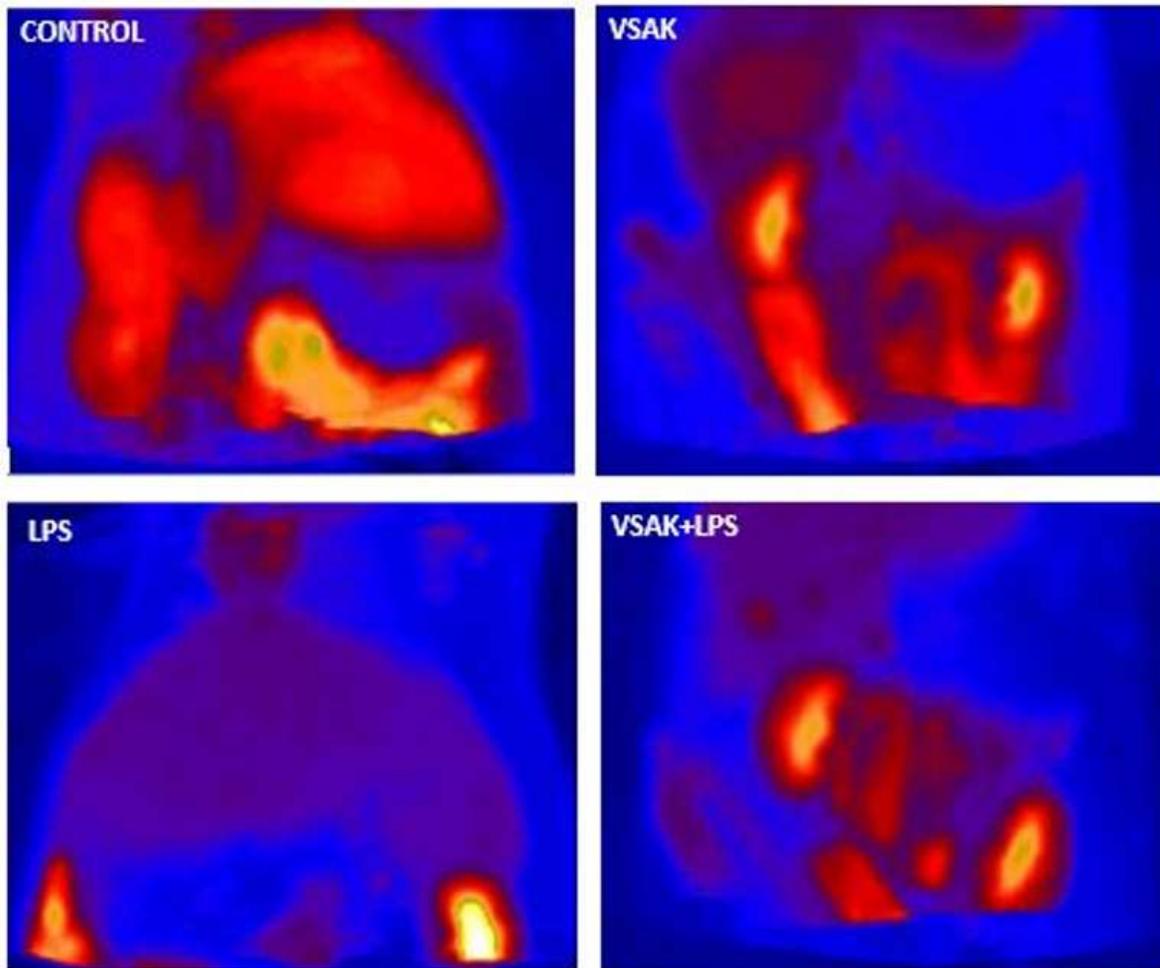


Figura 7. Comparativa de captación entre los distintos grupos. En la imagen se muestran la captación de 18FDG correspondiente a animales representativos de cada grupo. Las imágenes corresponden a la captación observada durante los 70 minutos de captura. En esta imagen se puede apreciar que la captación entre el grupo CONTROL y el grupo VSAK fue muy similar. También se apreció una disminución de captación en el grupo LPS con respecto a estos dos grupos. Finalmente, se observó que en el grupo VSAK+LPS la administración de péptido evitó esta disminución en la captación producida por los LPS.

En la Figura 8A se muestran imágenes que corresponde a los animales del grupo CONTROL, las cuales representan el último bloque temporal de captura. En estas imágenes se observa principalmente la zona que corresponde al hígado, el cual ocupa la mayor parte de la región observada.

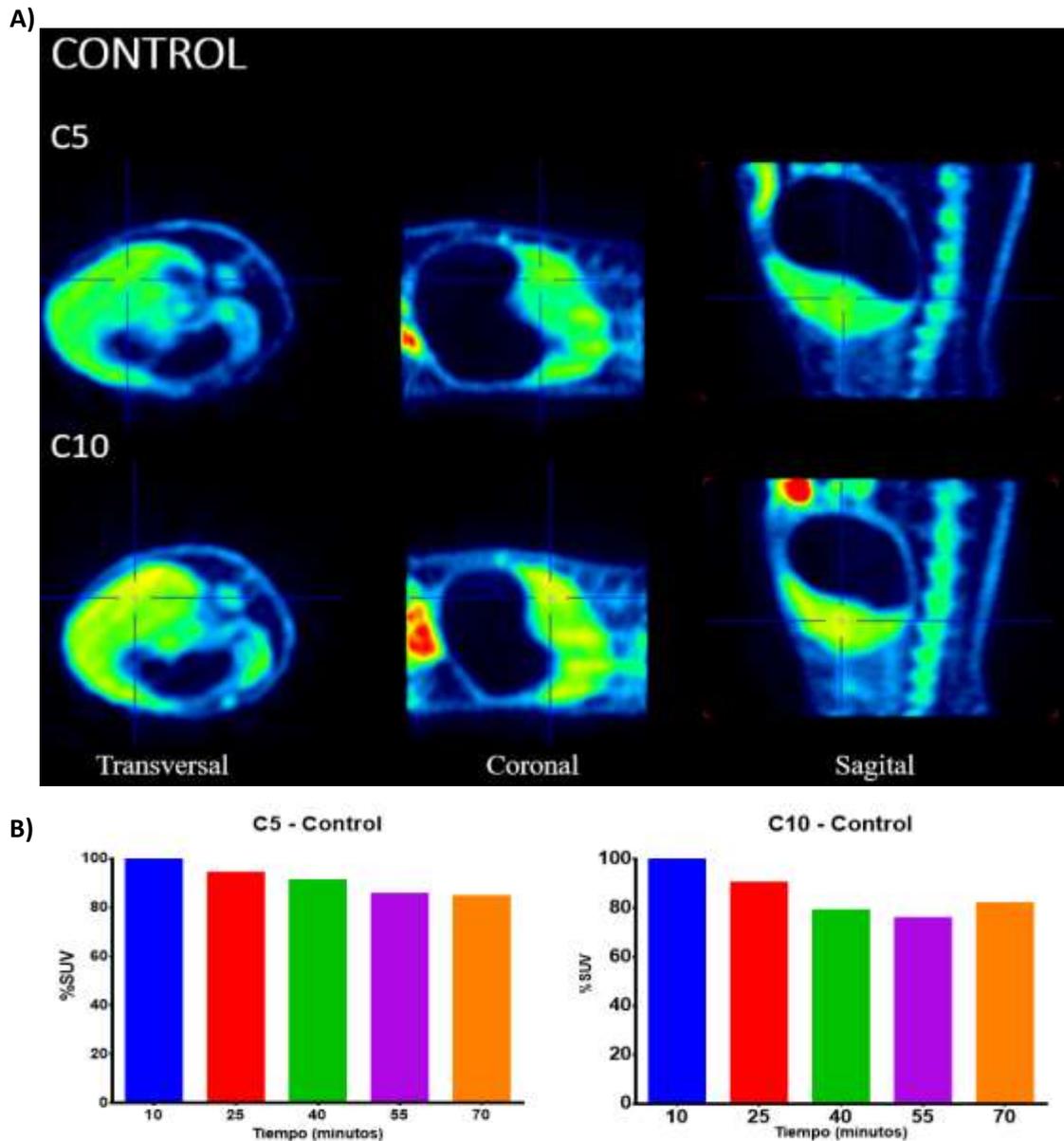


Figura 8. Captación en el grupo CONTROL. A) en los paneles se muestran las imágenes de captación correspondientes a los dos conejos (C5 y C10) que integraron el grupo CONTROL, estas imágenes ilustran la captura total durante los 70 minutos del experimento. Se presentan a los tres cortes correspondientes a los planos anatómicos de cada animal. B) Las gráficas muestran el %SUV de los animales del grupo CONTROL, en ambos animales se observó una disminución del %SUV en el tiempo. Del 100 al 84.4% para C5 y de 100% al 81.7 para C10.

Además, se observa la porción superior de las asas intestinales, así como los riñones los cuales presentan una alta actividad de captación asociada con el proceso de recaptura renal del radiotrazador.

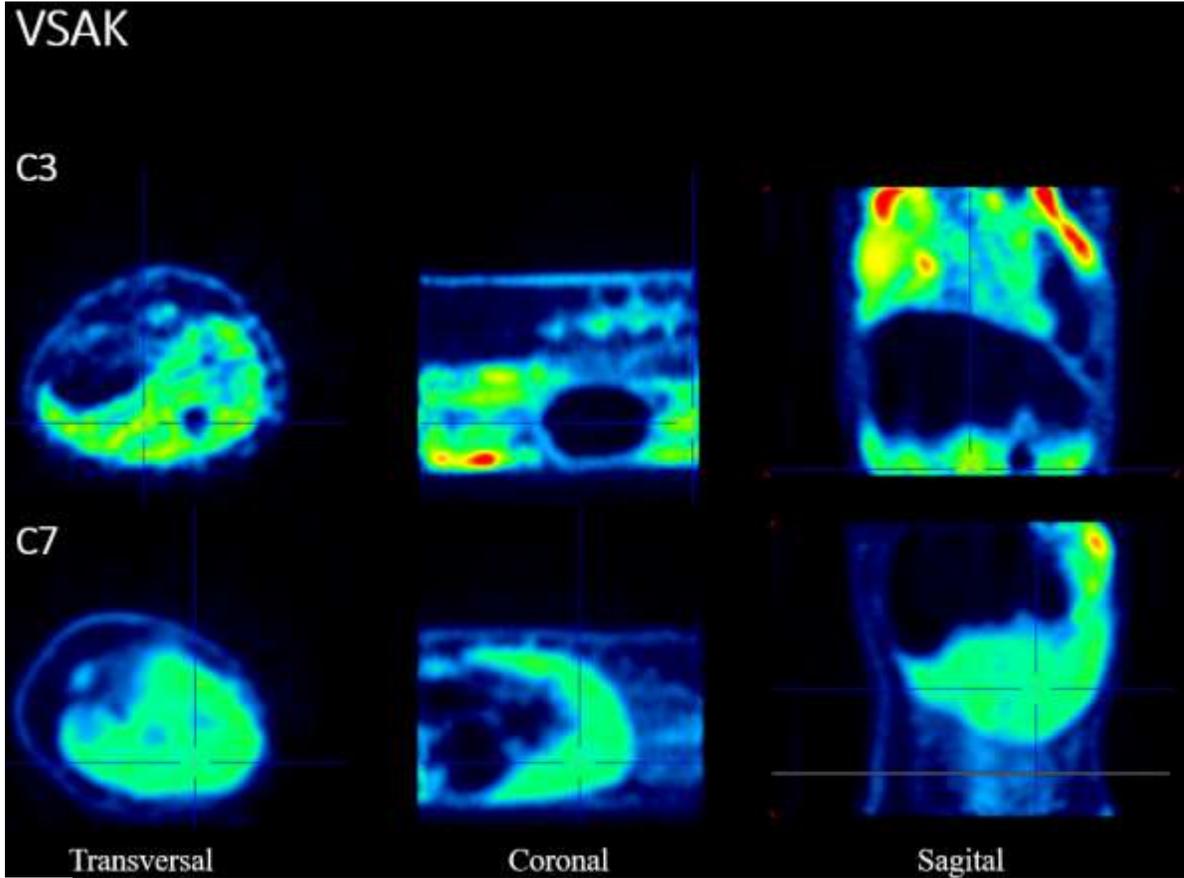
En todos los animales se observó una disminución en la captación del 18FDG en función del tiempo (Figura 8B), la cual puede ser explicada por la eliminación del radiofármaco al transcurrir el tiempo de captura. No obstante, fue este grupo en el que se observó una captación más homogénea de la marca durante el tiempo de captura.

Los datos obtenidos con este grupo se utilizaron para comparar el efecto de los tratamientos entre los distintos grupos. Sin embargo, la normalización de cada grupo utilizada en los análisis cuantitativos, se hizo considerando los primeros diez minutos de captura para cada animal como referencia de captación basal. Esto fue necesario debido a la gran variabilidad presente en los individuos del mismo grupo la cual atenuó el efecto de los distintos tratamientos.

Las imágenes que se presentan en la Figura 9A pertenecen a los animales que integraron el grupo VSAK. Estos animales se trataron con una dosis de péptido VSAK equivalente a la que se administró a los animales que se indujeron a choque séptico y la intención de este grupo era descartar cambios en los en la captación asociados exclusivamente con la administración de VSAK.

Al igual que en el grupo control, la disminución en la captación de 18FDG es homogénea conforme avanzó el tiempo de captura. Los animales no presentaron cambios importantes con respecto a lo observado en el grupo CONTROL. Tal y como se muestra en las gráficas de la figura 9B.

A)



B)

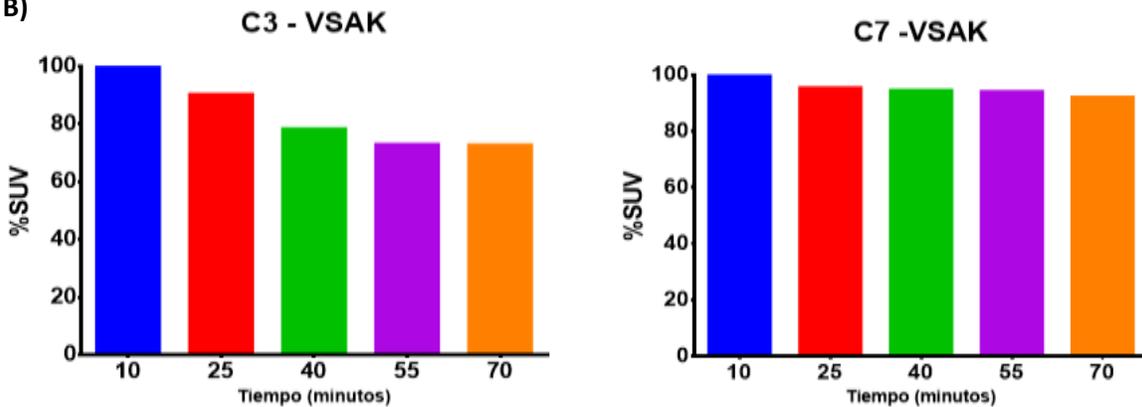


Figura 9. Captación en el grupo VSAK. A) en los paneles se muestran las imágenes de captación correspondientes a los dos conejos (C3 y C7), estos animales integraron el grupo VSAK, las imágenes muestran la captura total durante los 70 minutos del experimento. Se presentan los tres cortes correspondientes a los planos anatómicos de cada animal. B) Las gráficas muestran el %SUV de los animales del grupo CONTROL, Ambos animales presentaron una disminución del %SUV en el tiempo, del 100 al 72% para C3 y de 100% al 91. para C7.

El tercer grupo estuvo conformado por los animales que fueron administrados con LPS para inducir un estado similar al choque séptico (Figura 10A). En estos animales se observó una disminución más pronunciada en el valor de captación de ^{18}F FDG con respecto a lo observado en los animales de los grupos CONTROL y VSAK (Figura 10B). En adición a esta disminución de la captación, durante las capturas los animales mostraban un claro deterioro del estado de salud general.

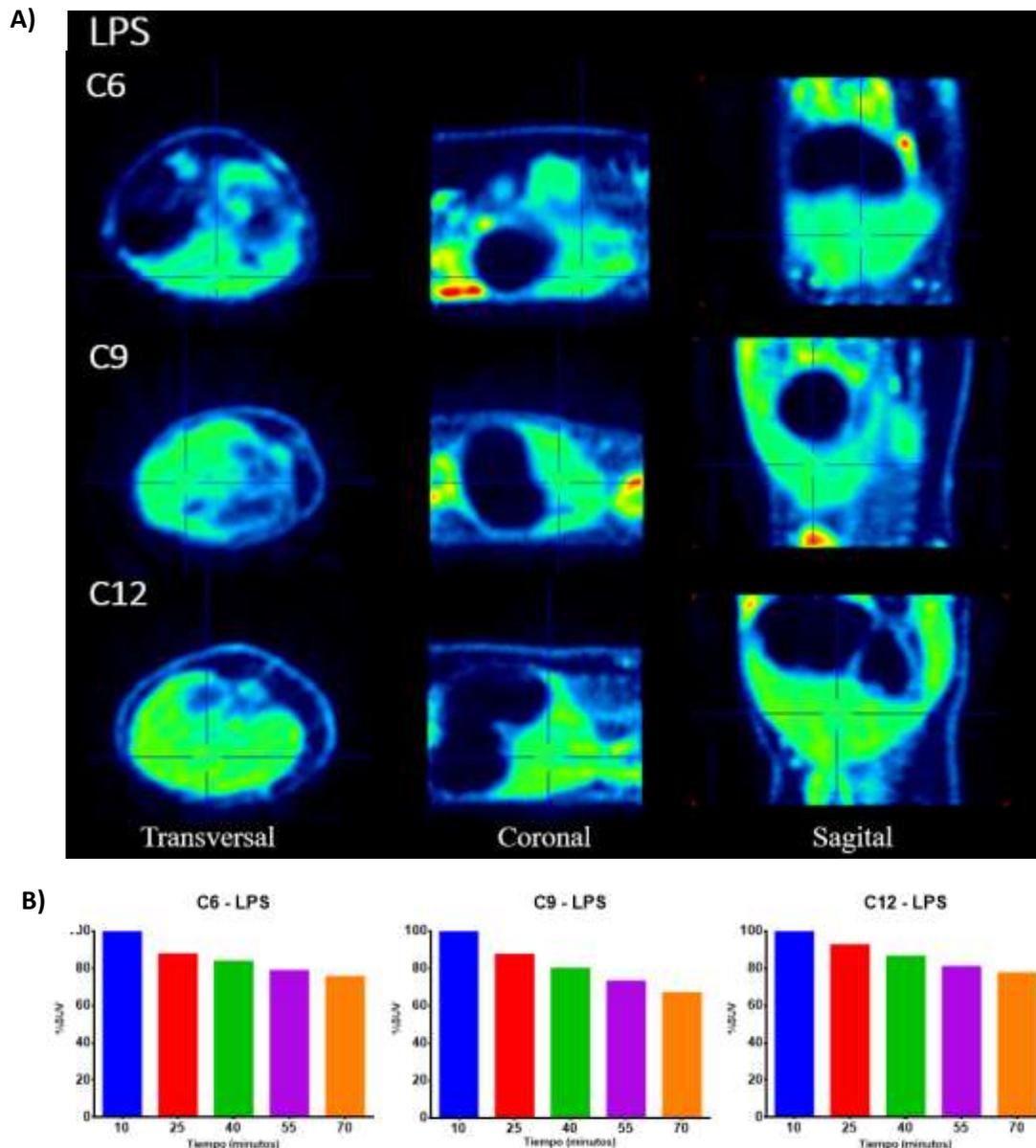
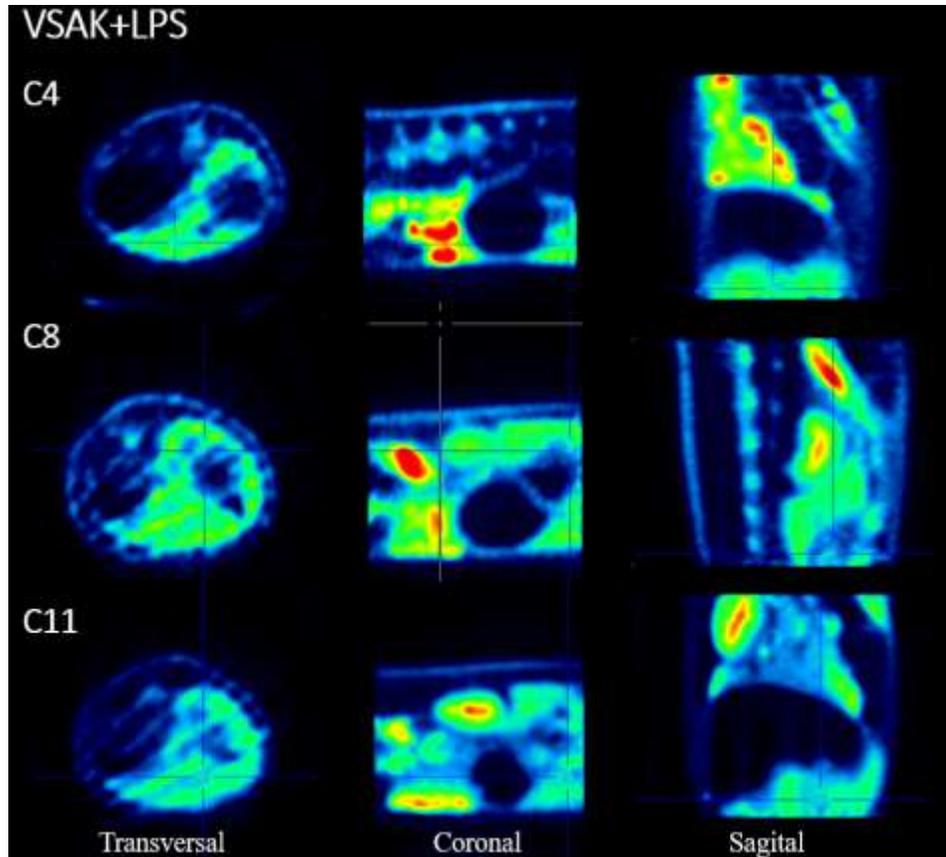


Figura 10. Captación en el grupo LPS. A) en los paneles se muestran las imágenes de captación correspondientes a los dos conejos (C6, C9 y C12), estos animales integraron el grupo LPS. Las imágenes muestran la captura total durante los 70 minutos del experimento. Se presentan los tres cortes correspondientes a los planos anatómicos de cada animal. B) Las gráficas muestran el %SUV de los animales del grupo LPS. Los tres animales presentaron una disminución del %SUV en el tiempo. La cual fue del 100 al 75% para C6, de 100% al 66% para C9 y de 100% al 77%. para C12.

El último grupo experimental de este experimento fue administrado de forma simultánea con LPS y péptido VSAK. En estos animales la disminución en la captación de 18 FDG fue muy similar a la que se observó en los grupos CONTROL y VSAK (Figura 11A), lo que indica que la administración del péptido VSAK evito que se produjera la disminución del valor de captación observada en el grupo administrado con LPS, como se muestra en la Figura 11 B.

A)



B)

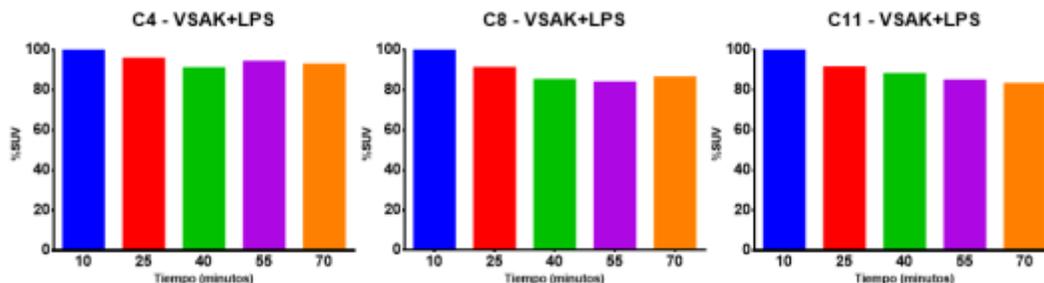


Figura 11. Captación en el grupo VSAK+LPS. A) En los paneles se muestran las imágenes de captación correspondientes a los dos conejos (C4, C8 y C11), estos animales integraron el grupo VSAK+LPS. Las imágenes muestran la captura total durante los 70 minutos del experimento. Se presentan los tres cortes correspondientes a los planos anatómicos de cada animal. B) Las gráficas muestran el %SUV de los animales del grupo VSAK+LPS. Los tres animales presentaron una disminución del %SUV en el tiempo. Esta disminución cual fue del 100 al 92% para C4, de 100% al 86% para C8 y de 100% al 82%. para C11.

8.1.2. Análisis cuantitativo

Además de proporcionar datos cualitativos del consumo del radiotrazador, el experimento de microPET nos permitió realizar un análisis del consumo de ^{18}F FDG en zonas específicas. Estas regiones pueden ser definidas específicamente por lo que se pudo realizar el análisis de zonas correspondientes a órganos de interés.

Para realizar el análisis cuantitativo también se realizaron bloques temporales donde se mantuvo el mismo orden de división utilizando un primer bloque de 10 minutos que correspondiente a la ventana de tiempo previa a la administración de los tratamientos. Los 60 minutos del tiempo restante se dividieron en cuatro bloques de 15 minutos.

Debido a la gran diferencia que existe en el consumo de cada uno de los conejos, se normalizaron los datos utilizando el primer bloque de tiempo (10 minutos) como valor de consumo basal. Esta normalización se aplicó para los datos de SUV, así como para el ID/cc de los tejidos analizados.

8.1.2.1. Valor de captura estándar

Para estimar el valor del SUV de los órganos de interés se utilizaron esferas de 5mm de diámetro. Esta medida fue necesaria debido a que en los datos de algunos animales el cuadrante analizado no abarcaba toda la región correspondiente al órgano de interés, al utilizar este tipo de esferas se buscó evitar inconsistencias en los datos de consumo de los animales.

Los órganos que pudieron ser analizados mediante esta estrategia fueron el hígado y las asas intestinales, debido a que eran los únicos que contaban con un volumen suficiente para el análisis. Además, de ser zonas las que se observaron cambios importantes en el consumo de ^{18}F FDG.

En la Figura 12A se muestran los datos de SUV del hígado, los datos mostrados en esta grafica presentan concordancia con lo que se observa de forma cualitativa en las imágenes que fueron generadas a partir de los datos de captación. Los datos de captura indican que no hay una diferencia importante en el consumo de ^{18}F FDG durante los primeros 40 minutos de captura del estudio. Sin embargo, se observó

una tendencia a la disminución del valor del SUV, la cual es más notable en el grupo que se administró solo con LPS. Esto contrasta con el resto de los grupos, los cuales se mantuvieron relativamente homogéneos durante todo el experimento. En este análisis se observó que en el bloque del minuto 55 aparece una disminución significativa de captación del grupo LPS en comparación del grupo VSAK+LPS. Esta diferencia de SUV entre el grupo VSAK+LPS y el grupo LPS se mantuvo hasta el término del experimento, conservando un valor estadísticamente significativo. Los datos de SUV del intestino que se presentan en la Figura 12B muestran congruencia con lo que se observó en el hígado, y con estos datos también se observó una tendencia a una disminución más pronunciada del SUV del grupo LPS con respecto a los grupos CONTROL, VSAK y VSAK+LPS. En su conjunto, este análisis muestra que el efecto producido por la administración de LPS fue similar en diferentes órganos y que este fue atenuado por la administración de VSAK en el grupo VSAK+LPS.

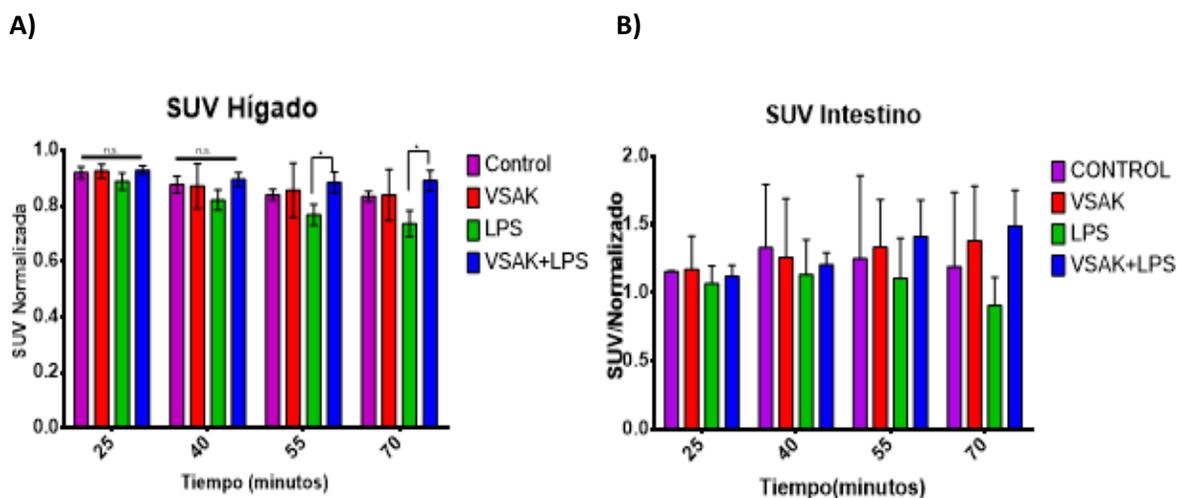


Figura 12 Comparación de SUV total de Hígado e Intestino. A) La gráfica muestra el valor normalizado del SUV del intestino para los diferentes grupos en los diferentes bloques temporales que se establecieron. No se encontraron diferencias significativas en los bloques de 25 y 40 minutos, aunque se observa una tendencia a la disminución del grupo LPS. En el bloque de 55 minutos se encontró una diferencia significativa entre el grupo LPS y el grupo VSAK+LPS ($p= 0.027^*$). En el bloque de 70 minutos también se observó una diferencia significativa entre los grupos LPS y VSAK+LPS ($p= 0.002$). B) En esta grafica se muestran los datos de SUV del intestino para los distintos bloques temporales. A pesar de que no se encontraron diferencias entre los bloques temporales, se observó una tendencia más pronunciada la disminución del SUV en el grupo LPS.

En el caso de los datos de ID/cc, los datos de captación se generaron utilizando el área observable del tejido de interés. Además, para estimar el ID/cc de estos tejidos se asumió que estos presentaban una densidad igual a la del agua (1 g/cm^3). Al igual que con los datos del SUV, los datos de ID/cc también se dividieron en bloques temporales iguales a los utilizados para la generación de las imágenes de captación y de datos de SUV, el valor de ID/cc también se normalizaron utilizando el primer bloque de 10 minutos como referencia de consumo basal.

En la Figura 13A se resumen los datos del ID/cc del hígado, a pesar de que no se observan diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales en los diferentes bloques temporales. Sin embargo, se puede notar que existe una tendencia en el grupo LPS a mostrar una tendencia al alza conforme avanza el tiempo de experimentación, aunque es importante destacar que el conjunto de datos de este tratamiento fue el que presentó mayor variación.

Los datos obtenidos del ID/cc del hígado contrastan con lo observado para los datos del ID/cc del intestino. En los datos del ID/cc del intestino presentes en la Figura 13B, se puede observar que existe una tendencia hacia la disminución en el ID/cc de los animales tratados con LPS, el cual pareciera ser atenuado por la administración de VSAK en lo animales del grupo VSAK+LPS.

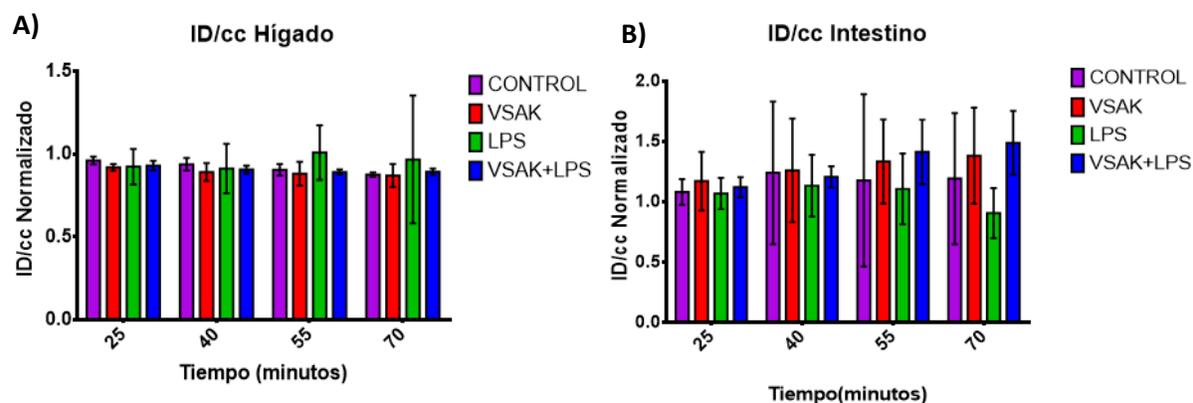


Figura 13. Comparación de %ID/cc total de Hígado e Intestino. A) La gráfica muestra los datos de las comparaciones temporales de los animales de los distintos grupos experimentales. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales en los distintos bloques temporales. A pesar de se observa una ligera tendencia al aumento en el grupo LPS, también es este grupo el que presentó mayor variación. B) Datos del SUV del intestino de los distintos grupos experimentales de los distintos bloques temporales. No se encontraron diferencias significativas en el análisis. Sin embargo, se encontró una tendencia la disminución en el grupo LPS. Los datos del %ID/cc de estos animales presentaron un comportamiento similar a los datos del SUV del intestino

8.1.3. Cambios en glucosa e insulina

En las muestras de suero recuperadas de los animales experimentales se hicieron mediciones del nivel de glucosa e insulina, realizados externamente por un laboratorio comercial certificado para el análisis de metabolitos en muestras animales.

Los resultados del análisis de estas dos moléculas se presentan en la Figura 14. En el panel A se muestra el nivel promedio de insulina en los grupos experimentales. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, se observó que el nivel promedio de Insulina del grupo LPS es ligeramente mayor al del resto de los grupos. Mientras que el grupo VSAK+LPS presenta el menor valor promedio de insulina circulante con respecto a los otros tres grupos experimentales.

En el caso del nivel de glucosa, cuyos datos se muestran en la Figura 14B. Independientemente de que los cambios observados en el nivel de glucosa no presentaron diferencias significativas, se observó una tendencia a la elevación de glucosa en el grupo experimental tratado únicamente con LPS.

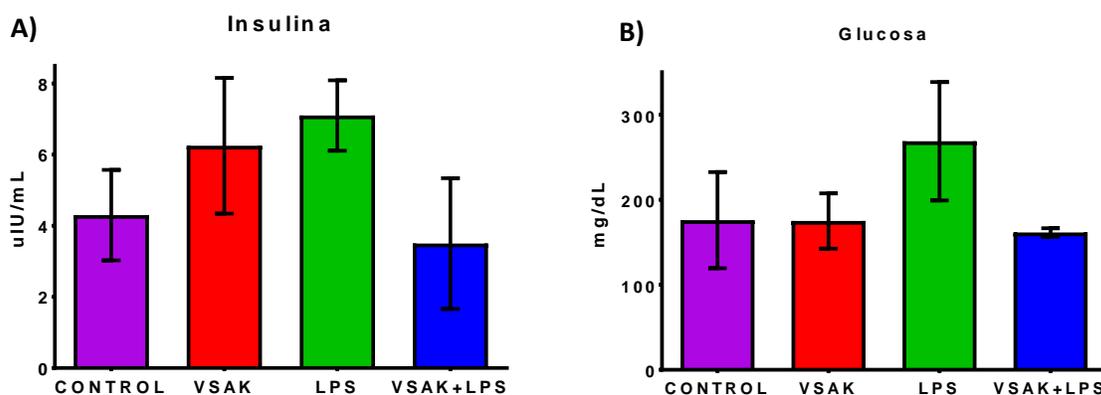


Figura 14. Nivel de insulina y glucosa en circulación. A) En la gráfica se muestran el nivel promedio de insulina de los distintos grupos experimentales. En este experimento no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos, sin embargo se observa un nivel promedio más alto en el grupo LPS (7.1 ± 0.98) con respecto al resto de grupos (CONTROL 4.3 ± 1.27 , VSAK 6.25 ± 1.9 y VSAK+LPS 3.5 ± 1.8). B) La grafica muestra los datos del nivel de glucosa promedio en circulación. A pesar de que en este experimento no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, se observó que el nivel de glucosa en los animales del grupo LPS (268.5 ± 69.65) fue ligeramente mayor al del resto de los grupos (CONTROL 176 ± 56.57 , VSAK 175 ± 32.53 y VSAK+LPS 161.5 ± 4.9).

8.1.4. Marcadores pro-inflamatorios

Otro de los aspectos analizados en nuestro modelo fue el desarrollo del proceso inflamatorio en los animales inducidos a choque séptico. Para ello, se realizó el análisis de diversas citocinas involucradas en el desarrollo del proceso inflamatorio que conduce a choque séptico.

El análisis se realizó utilizando un kit para medición de múltiples citocinas pro-inflamatorias. Este sistema nos permitió medir los niveles circulantes de IL-1A, IL-1B, MIP-1B, IL-8, Leptina, MMP9, NCAM-1 y TNFa (Figura 15). Estas citocinas han sido reportadas por estar involucradas en el desarrollo de la respuesta inflamatoria en distintas fases del proceso.

El TNFa es una de las principales citocinas involucradas en el desarrollo del proceso inflamatorio y tiene una importancia especial en el desarrollo de choque séptico. El aspecto más destacable de esta molécula fue el aumento del nivel de esta en los animales del grupo LPS y VSAK+LPS con respecto a lo observado en los grupos CONTROL y VSAK. Aunque este aumento no fue significativo, puede apreciarse que el grupo LPS fue el que presentó un mayor nivel de esta citocina.

El análisis de IL-1A presentó tendencias similares a las observadas en el nivel de TNFa. Se observó un incremento en esta citocina en los grupos LPS y VSAK+LPS con respecto al grupo CONTROL y VSAK. Sin embargo, el grupo VSAK+LPS fue el que presentó el nivel más elevado de esta citocina, a pesar de que este cambio no fue significativo.

El nivel de IL-1B presentó un comportamiento correspondiente al que se observó en el análisis TNFa. Los niveles más bajos de esta citocina fueron presentados por los grupos CONTROL y VSAK. Esto contrasta con lo observado en el grupo LPS el cual presentó el nivel más alto de IL-1B, con una diferencia significativa respecto al grupo VSAK. A pesar de que en el grupo VSAK+LPS se observó un aumento de esta citocina, el nivel fue menor al observado en el grupo LPS.

La quimiocina MIP-1B presentó una tendencia parecida a la de IL-1A, en este análisis el grupo CONTROL y el grupo VSAK presentaron el menor nivel de esta

quimiocina. Lo cual contrasta con lo observado en los grupos LPS y VSAK+LPS, los que presentaron un mayor nivel de MIP-1B. Cabe resaltar que el mayor nivel de esta citocina fue presentado por el grupo VSAK+LPS, aunque esto no fue significativo en comparación con los otros grupos.

El análisis de IL-8 indicó que no existieron diferencias significativas para esta citocina entre los distintos grupos experimentales. A pesar de esto se observó una tendencia similar a la presentada por MIP-1B, en la cual los grupos VSAK y CONTROL presentaron el menor nivel de esta citocina en comparación con los grupos LPS y VSAK+LPS.

El nivel de Leptina en los grupos experimentales tampoco presentó cambios significativos. Pese a esto, el nivel de esta citocina en circulación muestra un comportamiento similar al observado con otras citocinas analizadas, mostrando un ligero incremento en los grupos LPS y VSAK+LPS en contraste con los grupos CONTROL y VSAK

La proteína MMP-9 no presentó cambios significativos en la comparación entre grupos. Sin embargo, los datos mostraron una tendencia similar a la observada con otras citocinas. Se encontró un incremento del nivel de MMP9 en los grupos LPS y VSAK+LPS comparados con los grupos CONTROL y VSAK, y este incremento pareciera ser mayor para el grupo LPS en comparación con el grupo VSAK+LPS.

La última molécula analizada fue NCAM-1, una molécula de adhesión activada durante el proceso inflamatorio. Esta no mostró cambios significativos entre los distintos grupos experimentales, presentando valores homogéneos para todos los grupos experimentales. Para esta molécula tampoco fue posible observar alguna tendencia destacable, en comparación a lo observado con otras citocinas y moléculas asociadas al proceso inflamatoria.

A pesar de que en muchos de los casos de las citocinas analizadas el análisis estadístico indicó que no existen cambios significativos entre los grupos, hay tendencias resaltables que apoyan el efecto neutralizador del péptido VSAK frente al tratamiento con LPS. Este efecto se apoya en la capacidad de VSAK para atenuar

algunos cambios en estas moléculas pro-inflamatorias asociados a la administración de LPS. Otro aspecto destacable es la baja respuesta mostrada ante la administración del péptido, indicada por la ausencia de cambios en el grupo VSAK con respecto al grupo CONTROL en las distintas citocinas. Además, las moléculas como TNF α , e IL-1 β sirven como indicadores del efecto protector de VSAK en condiciones de choque séptico, al mitigar la producción de moléculas pro-inflamatorias.

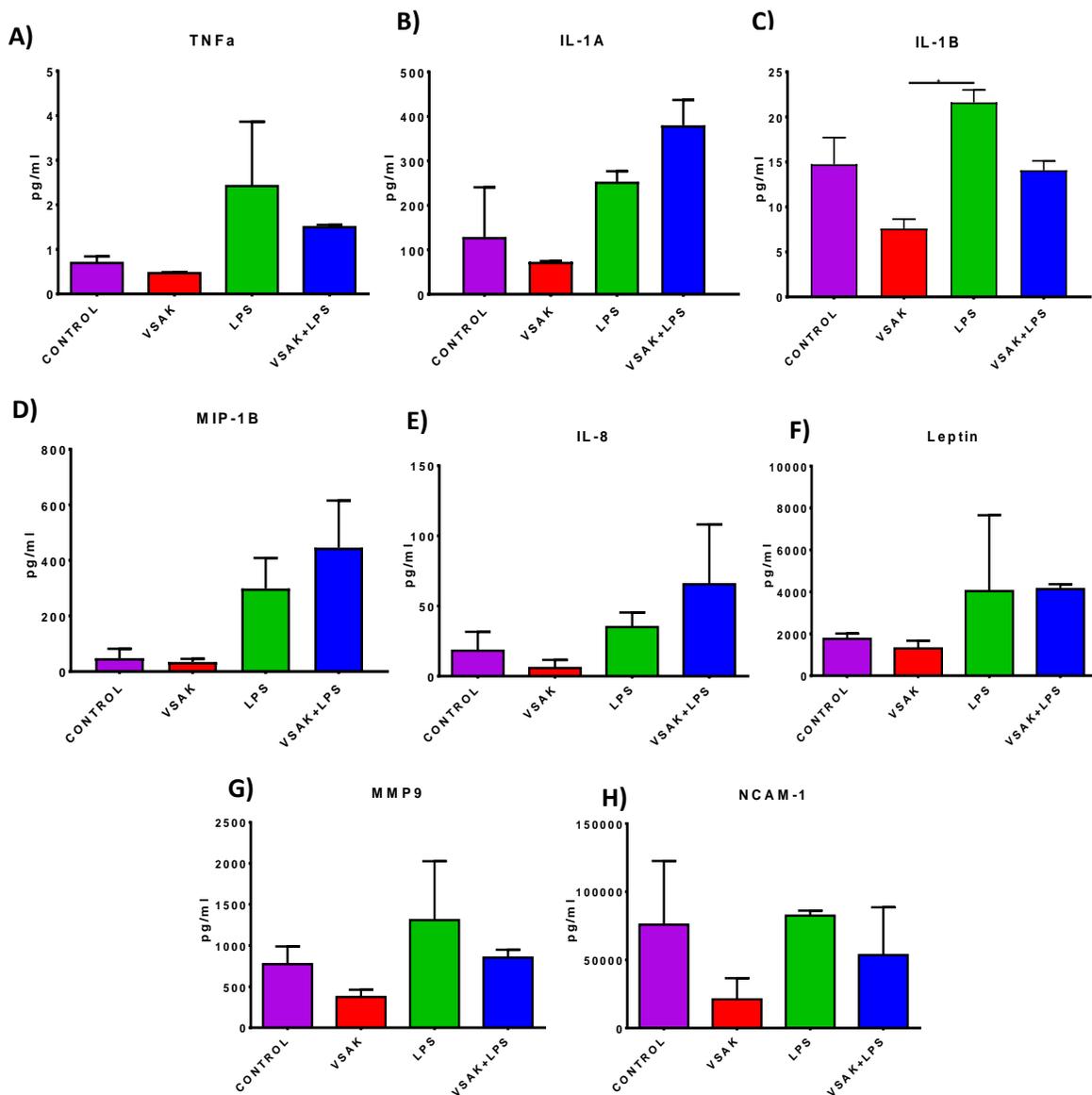


Figura 15. Marcadores pro-inflamatorios en el modelo administrado con LPS 300ng/Kg. Las gráficas muestran el valor promedio en circulación para los marcadores pro-inflamatorios: **(A)** TNF-a, **(B)** IL-1A, **(C)** IL-1B, **(D)** MIP-1B, **(E)** IL-8, **(F)** Leptina, **(G)** MMP-9 y **(H)** NCAM-1.

8.2. Segundo Experimento - Modelo de choque séptico con LPS 450 ng/kg

8.2.1. Análisis cualitativo

Con la finalidad de mejorar la apreciación del efecto de los tratamientos en los animales experimentales, se planteó un nuevo experimento para analizar los cambios de captación de radiotrazador.

Se realizaron capturas dinámicas de captación en PET, y el fármaco utilizado fue 18FDG como agente radiotrazador. En este experimento los animales recibieron una dosis mayor de LPS (450ng/kg). Además, se modificó el esquema de tiempos para la administración de los distintos tratamientos. También se modificó la duración de la captura de datos de PET prolongándola hasta los 90 minutos. La modificación en el tiempo captura se consideró que en el experimento anterior los principales cambios en los valores de captación se observaron después de los 60 minutos, al mismo tiempo se evitó que el tiempo de captura excediera el tiempo de vida media de la 18FDG (120 minutos).

Para realizar el análisis cualitativo de este experimento se optó por generar bloques temporales dividiendo el tiempo total de captura en nueve bloques de 10 minutos. A partir de estos bloques se generaron imágenes y videos para cada uno de los animales de los distintos grupos experimentales. Además, se generaron imágenes correspondientes a los 90 minutos de captura para cada animal

En la Figura 16 se presenta una imagen comparativa de animales pertenecientes a los distintos grupos experimentales obtenida del renderizado tridimensional. En este panel de imagen se puede observar la similitud que existe en la captación de 18FDG del grupo CONTROL y el grupo VSAK. También se aprecia la disminución que la disminución en la captación de radiotrazador en el grupo LPS. Finalmente, en el grupo VSAK+LPS muestra una captación similar a la de los grupos CONTROL y VSAK, lo cual se asocia con un efecto atenuador de la administración de LPS producido por la administración conjunta del péptido VSAK.

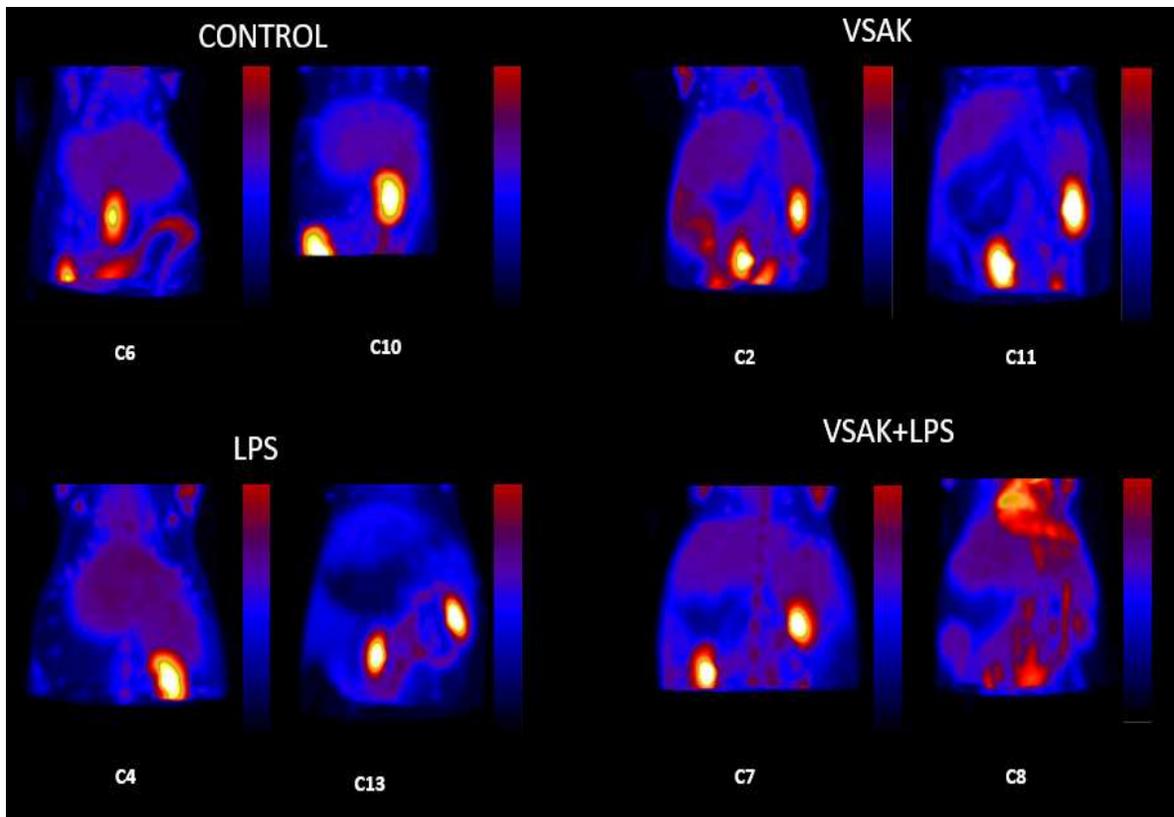


Figura 16. Comparativa de captación entre grupos. En esta imagen se muestra a dos distintos integrantes de cada uno de los grupos experimentales. En esta imagen se puede apreciar que el consumo de ^{18}F FDG entre los animales CONTROL y VSAK también fue muy similar en los animales de este experimento. Además, puede observarse que existe una disminución de la captación en los individuos que pertenecen al grupo LPS con respecto a los integrantes del grupo CONTROL y el grupo VSAK. Sin embargo, pareciera que el efecto de los LPS se ve atenuado por la administración del péptido VSAK, como se observa en el grupo VSAK+LPS. Las imágenes corresponden a 90 minutos de captura, estas imágenes se generaron a partir de un renderizado tridimensional de los datos de captación

En la Figura 17 se muestran las imágenes de las capturas de los animales del grupo CONTROL (animales C6 y C10) estos animales recibieron solución salina a través de las venas marginales de las orejas, simulando la administración de los tratamientos en el resto de grupos, estas imágenes son representativas de los 90 minutos de captura del experimento.

Las imágenes corresponden a la zona torácico abdominal de los animales, en estas imágenes el hígado también ocupa la mayor parte del cuadrante. Sin embargo, los animales utilizados en este experimento tenían una talla mucho menor a la del

primer experimento por lo que se pudo apreciar mejor el cuadrante de interés incluyendo los riñones de los conejos. Las imágenes de estos animales representan la captación basal de ^{18}F FDG durante el curso del experimento.

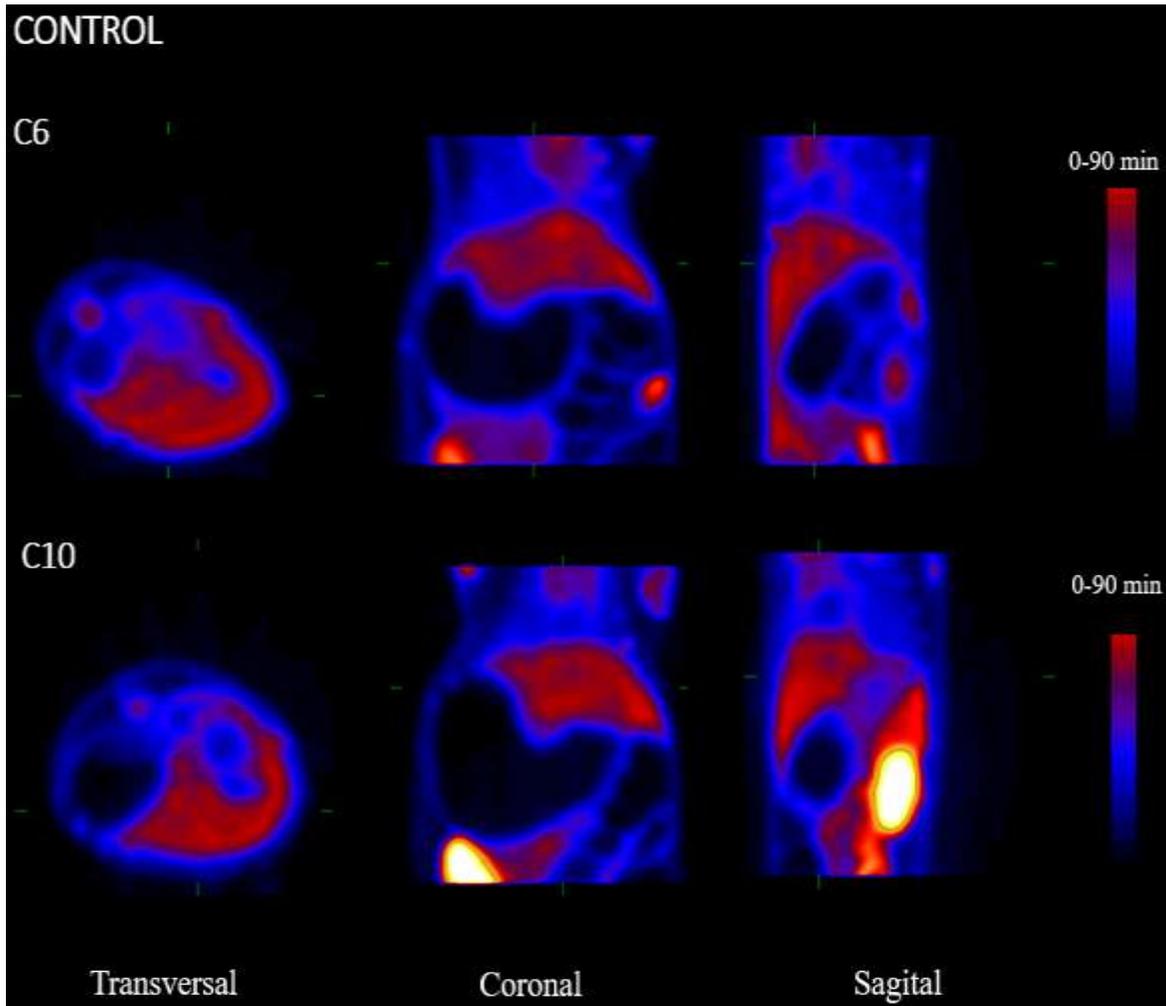


Figura 17. Captación el grupo CONTROL. En la imagen se muestran imágenes que corresponden a los animales que formaron parte del grupo CONTROL (C6 y C10), para cada uno de los animales de experimentación se presentan imágenes que representan a los tres planos anatómicos del individuo. Para la generación de estas imágenes se consideró el tiempo de total captura (90 minutos).

Las imágenes que corresponden a los animales del grupo VSAK se presentan en la Figura 18, administrados con el péptido VSAK (60 ug/kg). Las imágenes de estos animales representan los 90 minutos de captura. Se puede observar que la captación de estos animales fue muy similar a la de los animales del grupo control.

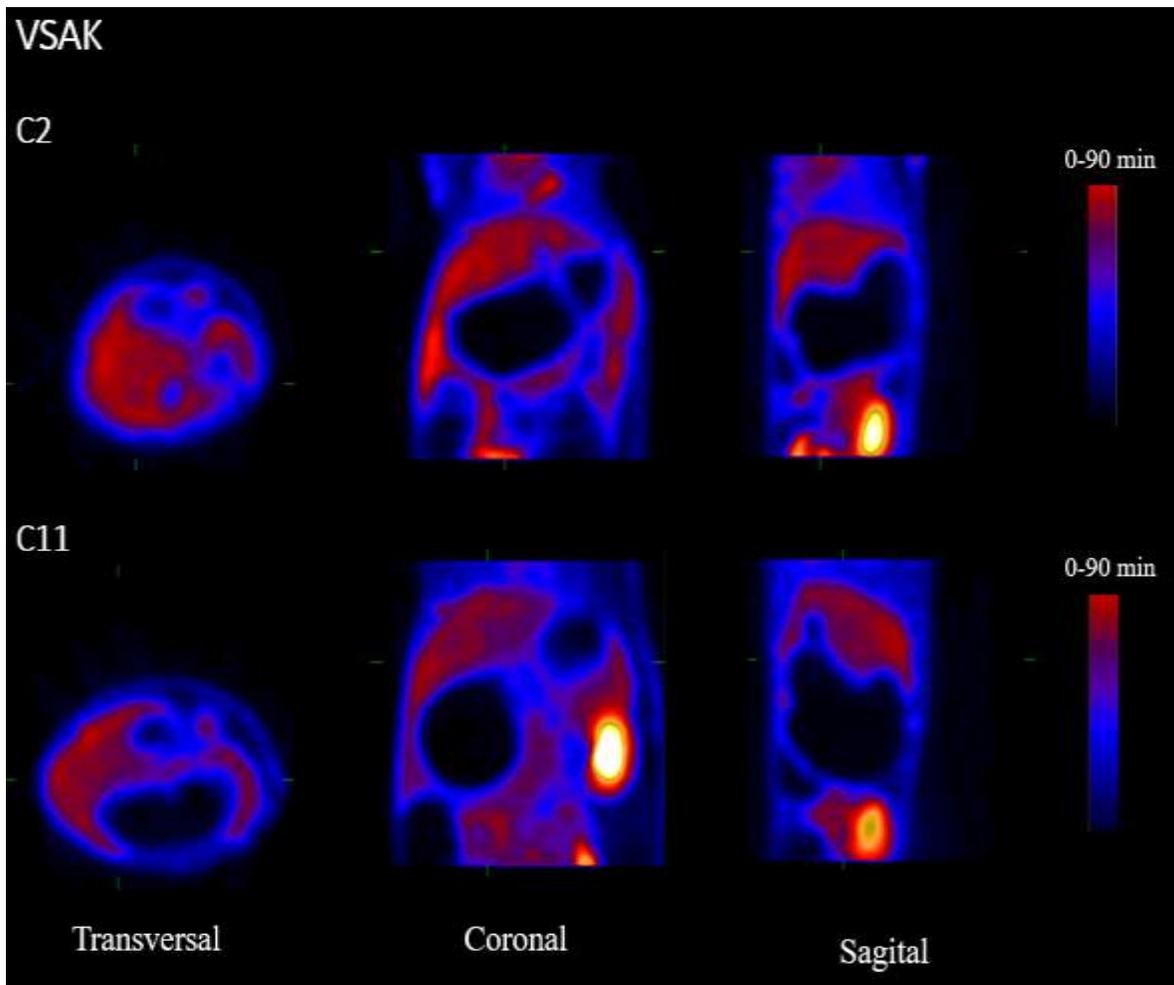


Figura 18. Captación el grupo VSAK. En la imagen se muestran imágenes que corresponden a los animales que formaron parte del grupo VSAK (C2 y C11), para cada uno de los animales de experimentación se presentan imágenes que representan a los tres planos anatómicos del individuo. Para la generación de estas imágenes se consideró el tiempo de total captura (90 minutos).

En la Figura 19 se muestran las imágenes representativas del tercer grupo el cual se indujo una condición similar al choque séptico mediante la administración intravenosa de LPS. En estos animales puede observarse una disminución de la captación de ^{18}F FDG en los diferentes tejidos en comparación con los grupos CONTROL y VSAK. En el caso del animal C3 en este grupo la captura corresponde solo a 70 minutos debido a que el animal falleció antes de concluir los 90 minutos programados para el experimento.

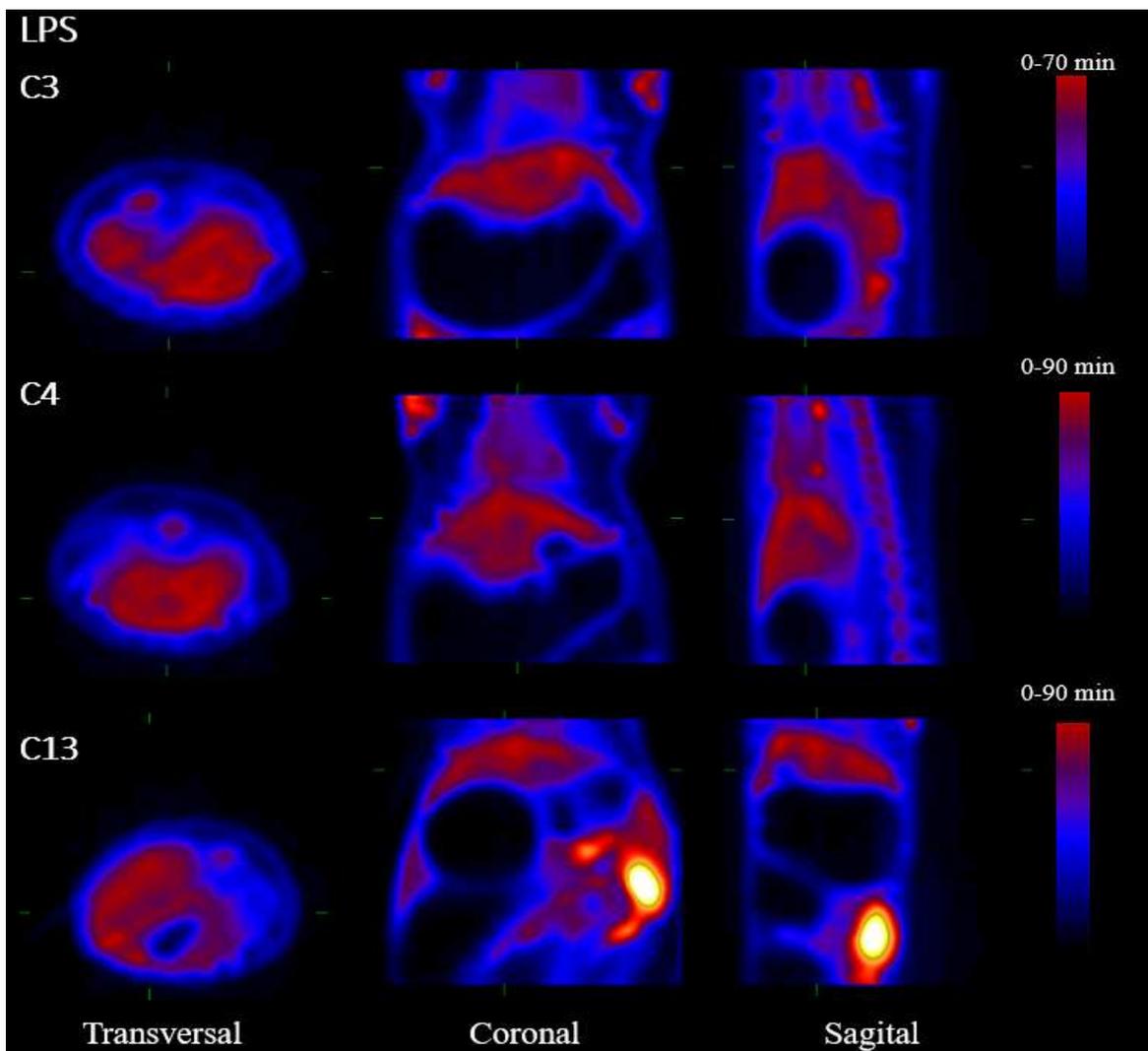


Figura 19. Captación el grupo LPS. En la imagen se muestran imágenes que corresponden a los animales que formaron parte del grupo LPS (C3, C4 y C13), para cada uno de los animales de experimentación se presentan imágenes que representan a los tres planos anatómicos del individuo. Para la generación de estas imágenes se consideró el tiempo total de captura (90 minutos). En el caso de C3, las imágenes corresponden solo a 70 minutos debido a que el animal falleció antes de completar el tiempo de captura programado.

En el grupo VSAK+LPS se observó un nivel de captación similar al del grupo CONTROL y el del grupo VSAK. Estos animales fueron administrados simultáneamente con LPS y el péptido VSAK, lo que indicaría que la administración del péptido mejora la captación en comparación con lo que se observa en el grupo LPS. Además, este efecto es congruente con lo observado en el primer experimento con LPS 300ng/Kg. Las imágenes representativas de los animales del grupo VSAK+LPS se muestran en la Figura 20.

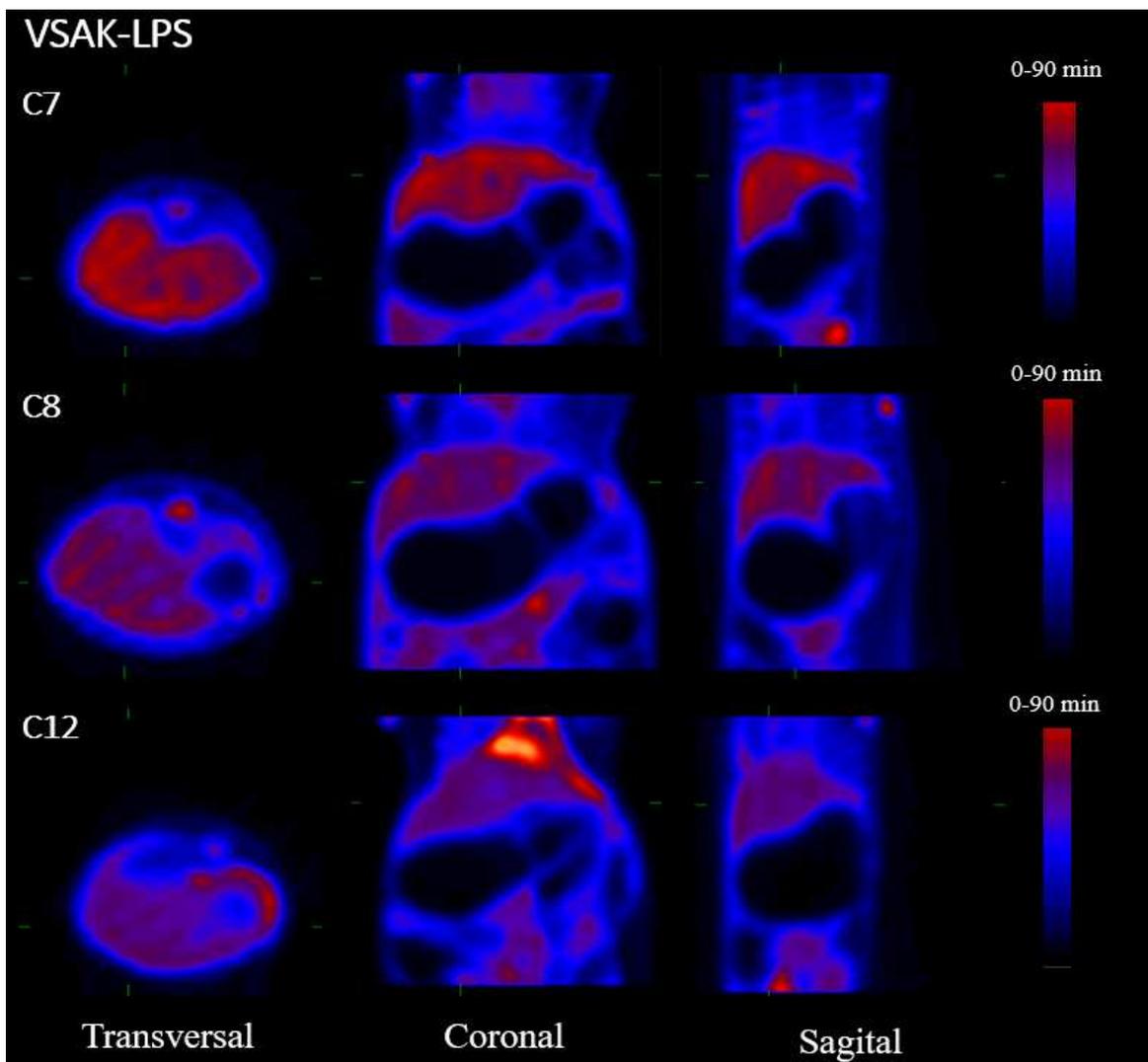


Figura 20. Captación el grupo VSAK+LPS. En la imagen se muestran imágenes que corresponden a los animales que formaron parte del grupo VSAK+LPS (C7, C8 y C12), para cada uno de los animales de experimentación se presentan imágenes que representan los tres planos anatómicos. Para la generación de estas imágenes se consideró el tiempo total de captura (90 minutos).

8.2.2. Análisis cuantitativo

8.2.2.1. Actividad específica final

En este experimento se realizó un análisis de la actividad residual de la 18FDG en los tejidos al termino del experimento realizando la disección de órganos de interés, a estos se les tomo una pequeña muestra la cual se pesó y se realizó la cuantificación de la actividad residual para estimar la actividad específica por cm^3 de tejido. Por separado, los órganos se pesaron para estimar la actividad residual del órgano completo.

Los datos de consumo de tejidos y órganos a partir de este análisis se muestran en las gráficas de la Figura 21. Gracias a este método obtuvieron datos de distintos órganos como son hígado, bazo, intestino delgado y estómago. Además, se cuantifico la actividad residual en la sangre.

En el panel A de la Figura 21 se muestra el %ID/cc del tejido de los animales de los distintos tejidos y de la actividad residual en sangre. A pesar de que no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos para los distintos órganos analizados es posible observar tendencias mostradas por algunos grupos. Lo más destacable es una tendencia a la disminución del valor del ID/cc en el grupo de animales administrados con LPS la cual se presenta en todos los tejidos, a diferencia de los grupos CONTROL, VSAK y VSAK+LPS. Sin embargo, esto no ocurre en la sangre en donde el valor del ID/cc presenta una alta homogeneidad entre los grupos. Al realizar las estimaciones del %ID de los órganos completos se observó que estos presentan la misma tendencia que los tejidos. Los datos de captación se muestran en el panel B de la Figura 21, en estos datos se observa una tendencia a la disminución del %ID en los órganos analizados para el grupo de animales que fue administrado con LPS, mientras que los grupos CONTROL, VSAK y VSAK+LPS muestran valores de %ID más homogéneos. Al igual que en el análisis de tejidos, los valores de %ID total para la sangre son más homogéneos entre los distintos grupos.

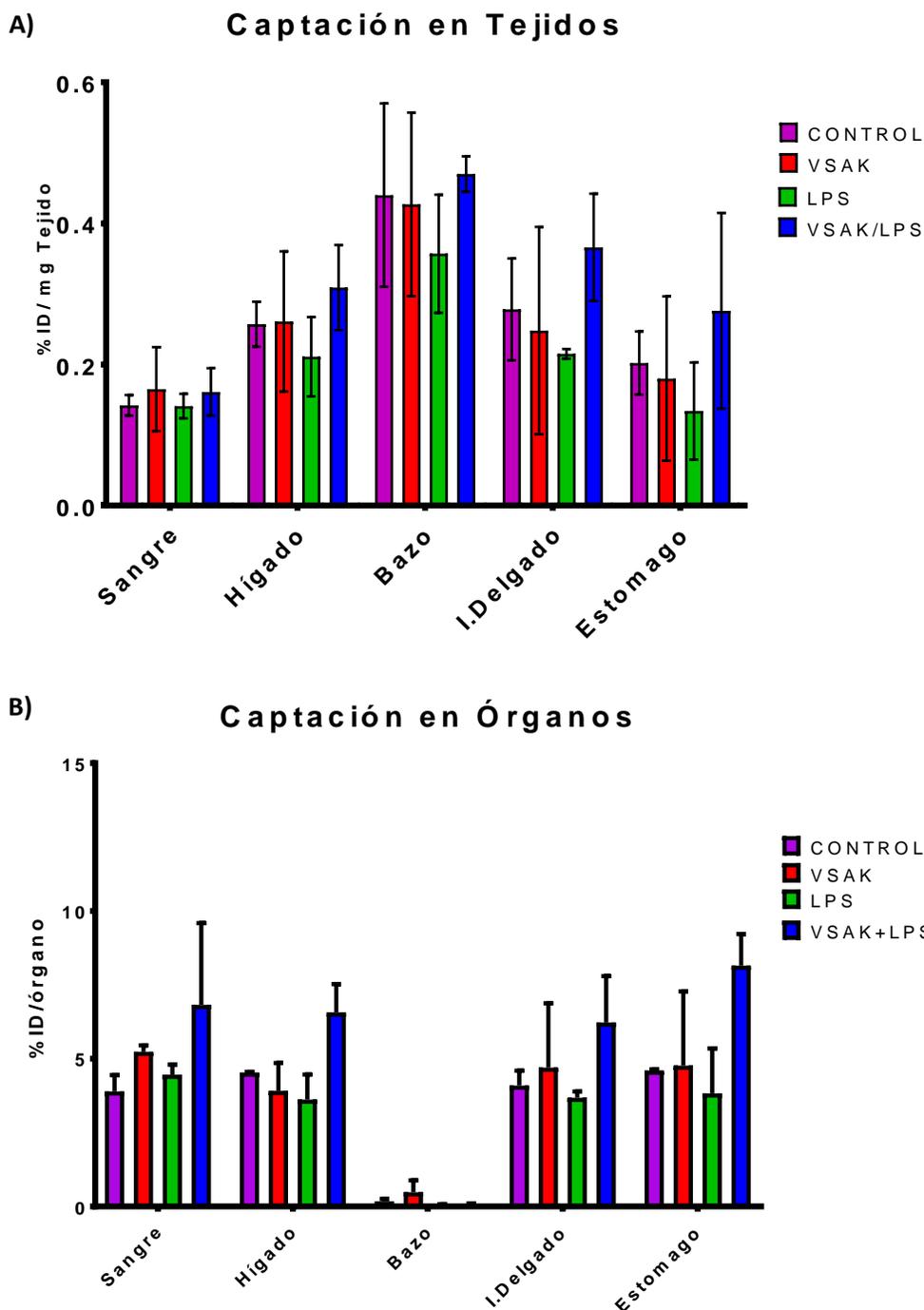


Figura 21. %ID/cc de tejidos y órganos al final del experimento. A) En esta gráfica se muestra la comparativa de %ID/cc obtenida directamente de una muestra de tejido perteneciente al órgano analizado. Esta comparación no arrojó diferencias significativas entre los distintos grupos. Sin embargo, puede observarse una tendencia generalizada a la disminución del valor del %ID/cc en el grupo LPS con respecto a los otros grupos, este efecto es similar al observado en análisis del experimento con 300ng de LPS. B) En esta gráfica se muestran los datos del %ID/cc para los órganos, esta estimación se realizó al multiplicar el valor de %ID/c del tejido por el peso total del órgano. En este análisis tampoco se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos. No obstante, se observa un comportamiento muy similar al del %ID/c de tejido, el cual mantiene las mismas tendencias observadas en el %ID/c de tejido.

8.2.2.2. Valor de captura estándar

Para realizar el análisis del SUV de los animales de experimentación se utilizó el área visible de los órganos en el cuadrante de exploración considerando lo que se observó en las imágenes obtenidas para el análisis cualitativo. En estos animales además de analizar los datos de SUV del hígado y el intestino, se analizó también el SUV de los riñones debido a que en las imágenes se percibían cambios en la captación de estos órganos. En este experimento los cambios en el SUV se analizaron en función del tiempo, para ello se consideraron los valores de captación en intervalos de un minuto. Los datos del análisis del SUV de los órganos de interés se muestran en la Figura 22. En el panel 22A se muestra la gráfica correspondiente al SUV del riñón derecho de los animales, en donde se observa que existió una clara diferencia en el consumo de ¹⁸F₁₈FDG en el grupo LPS. Esta diferencia en el consumo toma un valor significativo con respecto al grupo VSAK+LPS a partir del minuto 62, la cual se mantiene hasta el final del experimento. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los otros grupos.

En el riñón izquierdo se observó un comportamiento similar al que se observó en el riñón derecho, como se muestra en el panel B de la Figura 22. En este órgano el grupo LPS también mostró un incremento del SUV conforme transcurrió el tiempo, a diferencia de lo observado en los otros tres grupos

En las gráficas C y D de la Figura 22 se muestran los datos de consumo del hígado y del intestino, respectivamente. En el caso del hígado los valores del SUV de los diferentes grupos muestran valores bastante homogéneos entre los diferentes grupos. Lo mismo sucede en el caso del intestino en donde tampoco existen diferencias significativas entre los distintos grupos, aunque pareciera que el comportamiento de los grupos VSAK, LPS y VSAK+LPS fue más homogéneo entre estos grupos con respecto a los animales del grupo CONTROL.

Estos análisis indicaron que la administración de LPS produce alteraciones importantes en la captación del radiotrazador, que llevan a un aumento de la recaptura del fármaco en riñones. Esta alteración es amortiguada por la

administración del péptido VSAK, lo cual se observa en los datos del SUV de los animales del grupo VSAK+LPS.

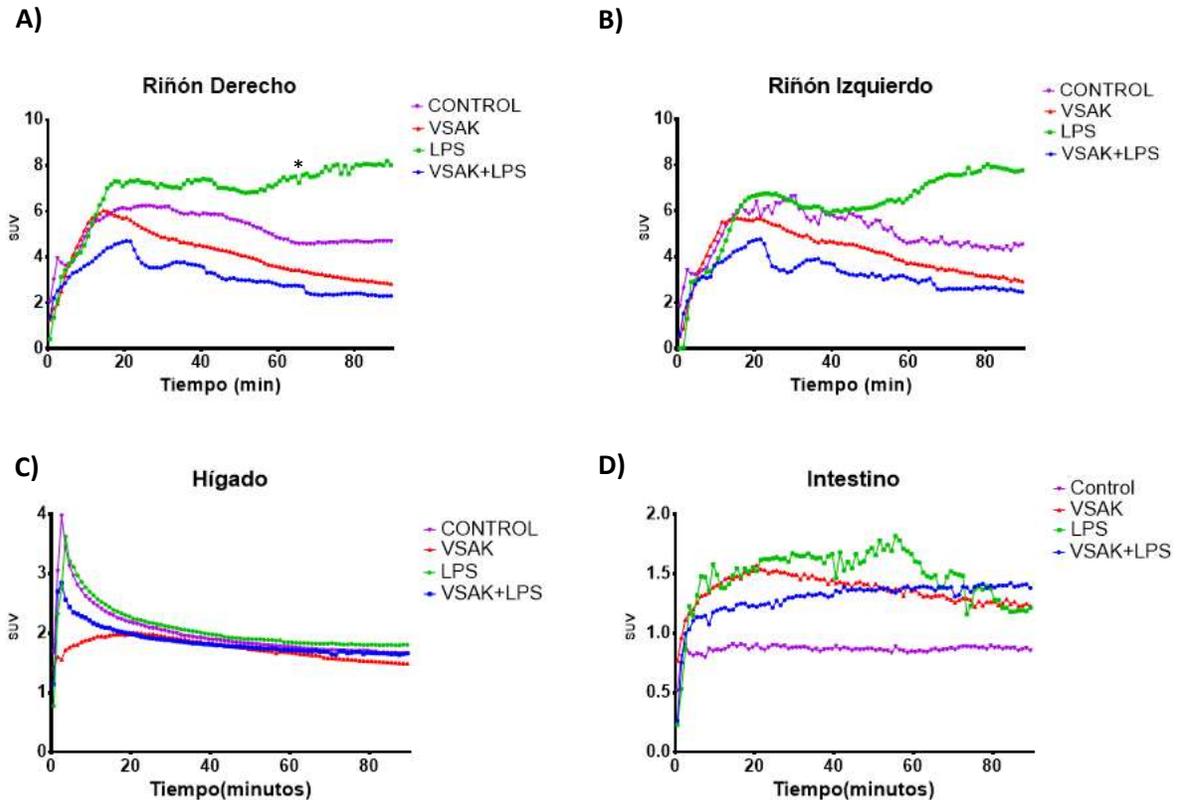


Figura 22. SUV de órganos durante el tiempo. A) Comparativa de SUV del riñón derecho durante los 90 minutos del experimento. En este análisis no se encontraron diferencias significativas entre los grupos CONTROL, VSAK y VSAK+LPS. Para el caso del grupo LPS existe una diferencia significativa con respecto al grupo VSAK+LPS a partir del minuto 68 ($p = 0.04$ *) el cual se mantiene hasta el minuto 90 ($p = 0.008$ **). También se presenta una diferencia significativa con respecto al grupo VSAK a partir del minuto 83 ($p = 0.047$ *) que se mantiene hasta el minuto 90 ($p = 0.04$ *). B) Datos de SUV del riñón izquierdo. A pesar de que en este conjunto de datos se observa un comportamiento similar al del riñón derecho, no se encontraron diferencias significativas entre grupos. C) La gráfica muestra el SUV del hígado de los distintos grupos. En estos datos no se encontraron diferencias significativas, atribuibles a la alta homogeneidad que presentan los animales en este órgano. D) Datos del SUV de intestino. En este conjunto de datos tampoco se encontraron diferencias significativas. Además, de que se observó un comportamiento muy homogéneo, principalmente entre los grupos VSAK, LPS y VSAK+LPS. Las barras de error estándar no se muestran en ninguna de las gráficas.

8.2.2.3. Valor de captación total

De forma complementaria al análisis de SUV en función del tiempo, se analizaron los cambios en SUV y %ID/cc a lo largo de todo el experimento para los mismos órganos, los cuales se presentan en la figura 23A y B respectivamente.

El %ID/cc de los animales corroboró lo observado en el análisis de captación temporal en los animales del grupo LPS. La captación de 18FDG en riñones en el grupo LPS presento un incremento importante en comparación con los otros grupos. Este incremento se atenuó por la administración de VSAK en los animales del grupo VSAK+LPS. Los datos de SUV también presentaron un incremento en la captación de 18FDG en los riñones de los animales del grupo LPS el cual también se vio atenuado en el grupo VSAK+LPS, aunque en este análisis la diferencia entre los grupos pareciera ser menor. Estos daros refuerzan el efecto protector de VSAK ante los efectos producidos por los LPS, al atenuar los cambios en la captación de 18FDG que se observó en el grupo LPS.

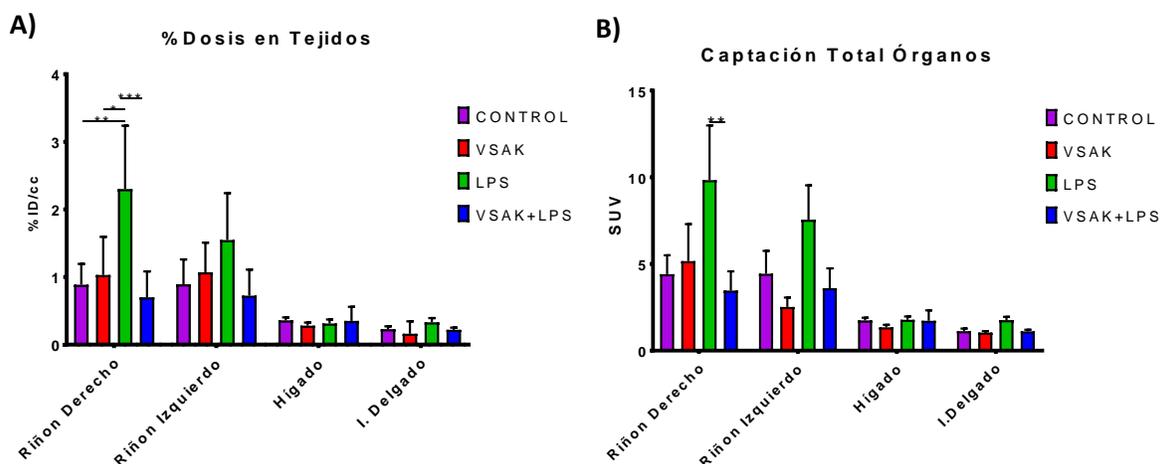


Figura 23. Captación total de en órganos. A) Datos obtenidos del %ID/cc de los riñones, hígado e intestino delgado. Se puede observar un incremento significativo en el valor promedio del SUV del riñón derecho en el grupo LPS (2.3 ± 0.93) en comparación con los otros grupos CONTROL (0.886 ± 0.3 , $p=0.005$ **), VSAK (1.03 ± 0.56 , $p=0.013$ *) y VSAK+LPS (0.7 ± 0.38 , $p=0.0005$ ***). Un efecto similar se observó en el riñón izquierdo, sin embargo, esto no presentó cambios significativos. No se observó ninguna tendencia clara para los datos del hígado y el intestino delgado. B) En la gráfica se muestra el SUV total obtenido de los datos de captación. Se puede observar que el SUV es significativamente mayor en el riñón derecho del grupo LPS (9.83 ± 5.45) con respecto al grupo VSAK+LPS (3.46 ± 1.9 , $p=0.008$ **). Un Efecto muy similar se observó en el riñón izquierdo, sin que esté presente cambios significativos. En los datos de %ID/cc de hígado e intestino delgado no se observó ninguna tendencia destacable

8.2.3. Monitoreo de signos vitales

Durante el experimento se monitorearon de forma constante la temperatura y la frecuencia respiratoria de los animales. En la Figura 24 se muestran los datos de obtenidos del monitoreo de estos parámetros. En el panel A se muestran los datos del registro de temperatura, y se nota que en todos los grupos hubo una disminución constante de la temperatura conforme transcurrió el tiempo de captura. Esta disminución de la temperatura podría atribuirse al uso de isoflurano durante los procedimientos. Sin embargo, se observa un cambio significativo en este parámetro en el grupo LPS comparado con el grupo VSAK+LPS, esta diferencia aparece a los 50 minutos y se mantiene hasta el final del experimento. Este efecto podría considerarse un indicador de la aparición de hipotermia en el grupo LPS, la cual se evitó por la administración de VSAK en el grupo VSAK+LPS.

El panel B de la Figura 24 muestra los datos de frecuencia respiratoria de los distintos grupos. En esta gráfica no se observó ninguna tendencia clara para ninguno de los grupos, y se debe a que este parámetro fue utilizado como referencia para la administración de anestesia en los animales por lo que se trató de mantenerlo en un valor estable.

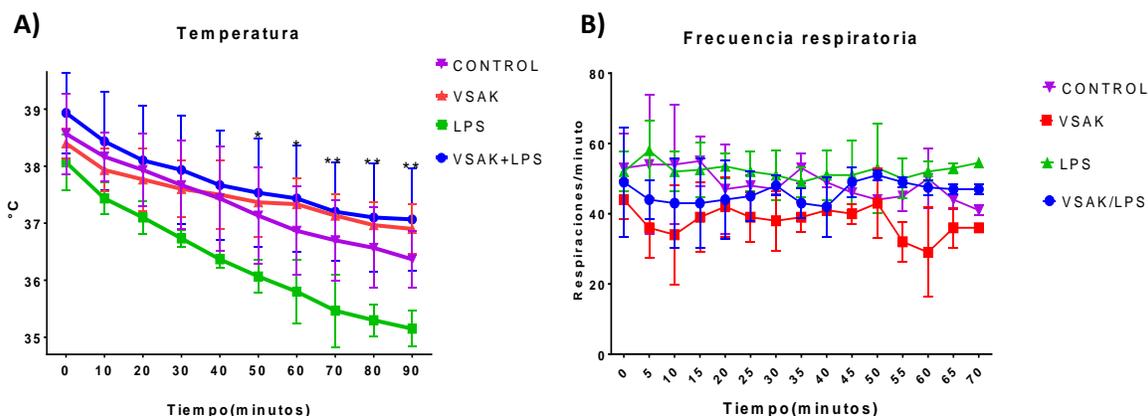


Figura 24 Datos de temperatura y frecuencia respiratoria. A). Datos de temperatura correspondientes a los distintos grupos experimentales, en todos los grupos se observa una tendencia a la disminución. Es posible observar que la disminución en la temperatura es más pronunciada en el grupo LPS al final del experimento (35.15 ± 0.31) con respecto a los otros tres grupos (CONTROL 36.36 ± 0.49 , VSAK 36.9 ± 0.43 y VSAK+LPS 37.06 ± 0.89 , $p = 0.003$ **). B) En la gráfica se muestran los datos de la frecuencia respiratoria de los animales experimentales. En este conjunto de datos no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, lo cual se debe al uso de este parámetro para realizar ajustes en la administración del anestésico de los animales.

8.2.4. Cambios en glucosa e insulina

En las muestras de plasma recuperadas de los estos animales tambien se realizo el análisis de glucosa e insulina, considerando los cambios que se habian observado en el primer experimento.

La Figura 25 muestra los resultados del análisis de estas moléculas. A pesar de que carecerr de diferencias significativas en el nivel de insulina, puede observarse una tendecia a un aumento del nivel circulante de insulina en los grupos LPS y VSAK+LPS (Figura 25 A). No obstante, este incremento pareciera ser mayor en el grupo LPS con respecto al grupo VSAK+LPS. Este resultado es congruente con lo observado en el primer experimento, a pesar del cambio en la dosis de LPS.

En nivel de glucosa mostró cambios importantes entre los grupos, tal como se muestra en la figura 25B. Mientras que los grupos CONTROL, VSAK mostraron un nivel similar de glucosa, se observó un aumento significativo de esta molécula en el grupo LPS. Sin embargo, este incremento no se produjo en el grupo VSAK+LPS, el cual mostró un nivel de glucosa similar al de los grupos CONTROL y VSAK. Este efecto también apoya la capacidad de VSAK para prevenir el los efectos producidos por LPS

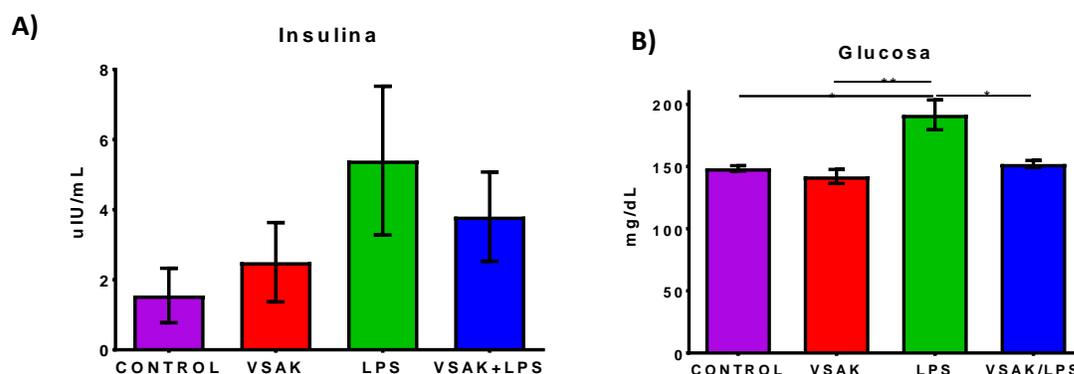


Figura 25. Nivel de insulina y glucosa en circulación. A) En la gráfica se muestran el nivel promedio de insulina para cada uno de los grupos experimentales. A pesar de que la comparación de grupos no arrojo diferencias significativas entre los grupos, se puede apreciar que el nivel promedio de insulina en el grupo LPS (5.4 ± 2.1) es mayor al observado en los otros grupos (CONTROL 1.5 ± 0.7 , VSAK 2.5 ± 1.13 y VSAK+LPS 3.8 ± 1.7). B) Datos del nivel circulante de glucosa. Se observó un aumento en el nivel circulante en el grupo LPS (191.5 ± 12.02) con respecto al grupo CONTROL (148.5 ± 2.12 , $p < 0.05$ *), VSAK (142 ± 5.65 , $p < 0.01$ **) y el grupo VSAK+LPS (152 ± 2.82 , $p < 0.05$ *), estos dos últimos también tuvieron valores grupos fueron más homogéneos en comparación.

8.2.5. Marcadores pro-inflamatorios

En los animales de este experimento también se realizaron mediciones de marcadores pro-inflamatorios, y los resultados del análisis de estas moléculas se presentan en las gráficas de la Figura 26.

El análisis de TNFa en estos animales presentó un comportamiento similar al observado en los animales del primer experimento, pero con cambios más pronunciados entre los grupos. A pesar de que no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales, dada la gran variación presente entre los animales del grupo LPS. El nivel de esta citocina en los grupos CONTROL, VSAK presentó concentraciones mínimas de TNFa (menores a 1pg/ml), lo cual contrasta con el grupo LPS que presentó un valor promedio de TNFa casi 30 veces mayor al de estos grupos. Sin embargo, en el grupo VSAK+LPS presentó una concentración de TNFa similar a la de los grupos CONTROL y VSAK, lo cual indica administración del péptido evitó los cambios en la producción de TNFa producidos por los LPS.

En este experimento IL-1A presentó un comportamiento similar al de TNFa, en contraste a lo observado en el primer experimento. Esta citocina presentó los menores niveles en los grupos CONTROL y VSAK, mientras que en el grupo LPS se mostró el nivel más elevado de esta molécula. Al igual que con TNFa, la administración de VSAK atenuó el incremento de esta citocina en el grupo VSAK+LPS.

IL-1B mostró una tendencia congruente con lo observado en TNFa y IL-1A, aún a pesar de la ausencia de diferencias significativas. Los grupos CONTROL y VSAK mostraron el menor nivel para esta citocina, el cual fue parecido entre estos dos grupos. En el grupo LPS se observó un incremento notable IL-1B, de forma similar a lo observado con otras citocinas. De forma congruente con lo observado con TNFa e IL-1A, el grupo VSAK+LPS presentó un nivel menor de IL-1B al del grupo tratado únicamente con LPS.

Los datos de las quimiocinas analizadas mantuvieron un comportamiento que reforzaba el efecto de VSAK sobre el modelo de choque. En el análisis de MIP-1B los niveles más bajos de MIP-1B se observaron en el grupo CONTROL y el grupo VSAK, mientras que el grupo LPS presentó un aumento notable en comparación con estos grupos. Sin embargo, esto no ocurrió en el grupo tratado con VSAK, y en el grupo VSAK+LPS se encontró un nivel notablemente menor de MIP-1B en comparación al del grupo que solo recibió LPS.

Correspondiendo con MIP-1B, el análisis de IL-8 indicó que los grupos CONTROL y VSAK presentaban niveles menores de esta citocina al compararlos con el grupo LPS, el cual presentó el nivel más alto de IL-8. A pesar de que en el grupo VSAK+LPS también se observó un ligero aumento de esta citocina, este fue menor al observado en el grupo LPS. Los resultados de MIP-1B e IL-8 indican que la administración de VSAK tiene un efecto sobre moléculas asociadas a la migración de células de sistema inmune, las cuales se producen en una fase intermedia durante el choque séptico.

El nivel de Leptina en los animales no presentó ningún cambio significativo entre los animales de los distintos grupos. Tampoco se encontró ninguna tendencia en el análisis de esta molécula entre los distintos grupos. Al igual que con Leptina, el análisis del nivel de MMP9 no presentó cambios significativos entre los distintos grupos. En este grupo de datos tampoco fue posible observar tendencias similares a las que se mostraron para otros marcadores analizados. Finalmente, para NCAM no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los distintos grupos y tampoco hubo tendencias particulares entre los grupos. Es posible que la ausencia de cambios en estas moléculas se deba al papel que estas juegan durante el desarrollo del proceso inflamatorio. A diferencia de las otras citocinas y quimiocinas analizadas, estas tres moléculas participan en fases posteriores del proceso inflamatorio; por ello es posible que, en nuestro modelo, el cual reproduce una forma aguda y severa de choque séptico, no se logren apreciar cambios en moléculas que se asocian a una etapa posterior de este estado.

Los cambios observados en los distintos marcadores inflamatorios indican que la administración de VSAK tiene un efecto benéfico sobre el desarrollo del proceso inflamatorio, al atenuar la producción de marcadores pro-inflamatorios producidos por la administración de LPS los cuales tienen un papel importante durante el desarrollo de choque séptico. Esto se observó principalmente en las citocinas y quimiocinas que se producen en estadios tempranos de esta condición, mientras que la ausencia de cambios en moléculas producidas en fases más avanzadas de esta patología podría estar relacionada con el modelo utilizado.

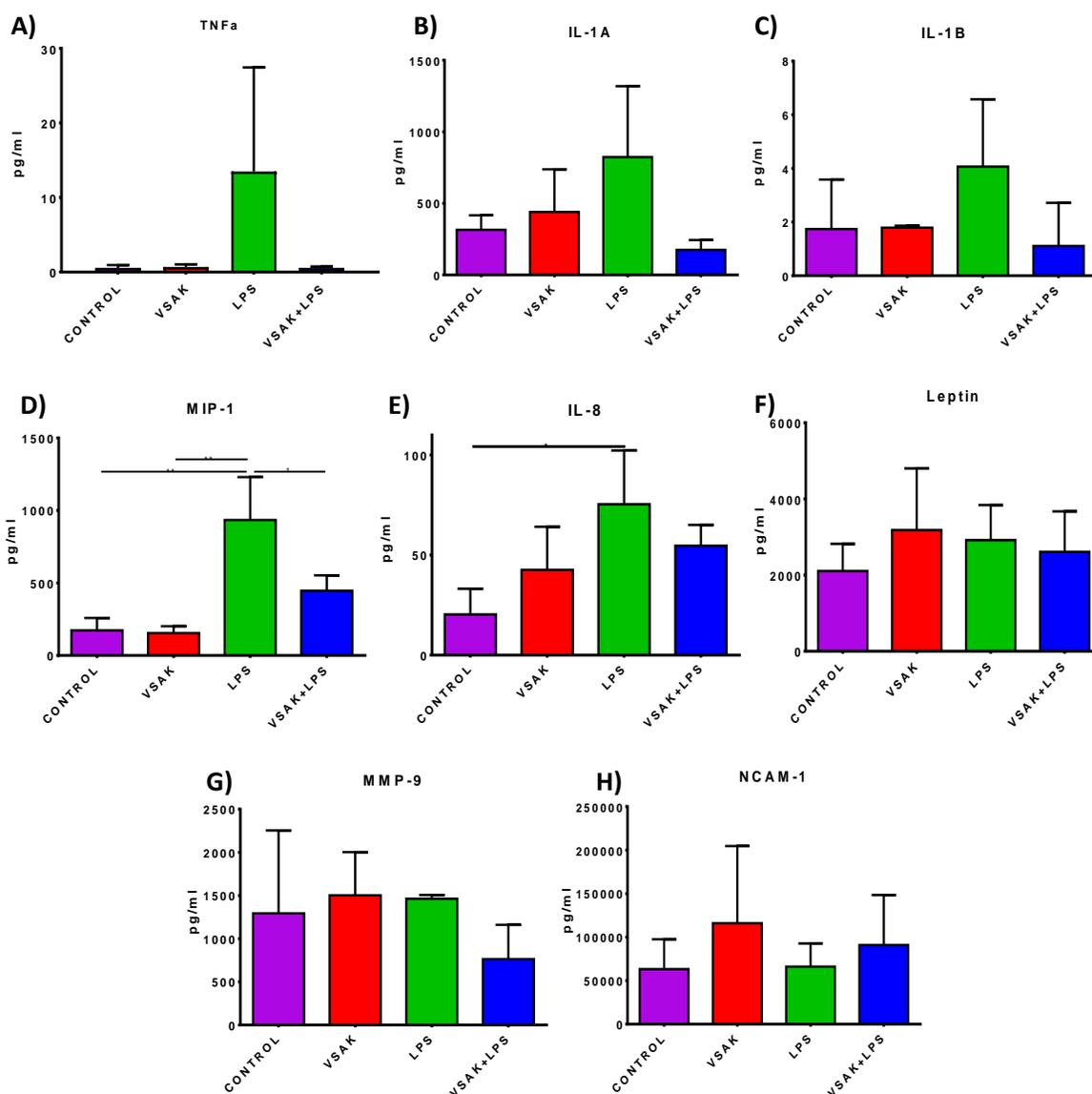


Figura 26. Marcadores pro-inflamatorios en el modelo administrado con LPS 450ng/Kg. Las gráficas muestran el valor promedio en circulación para los marcadores pro-inflamatorios: (A) TNF α , (B) IL-1A, (C) IL-1B, (D) MIP-1B, (E) IL-8, (F) Leptina, (G) MMP-9 y (H) NCAM-1.

9. Discusión

En este proyecto buscamos analizar los efectos del péptido VSAK en un modelo animal de choque séptico, con especial énfasis en el desarrollo de esta condición en los animales. Utilizamos el sistema de PET para evaluar el desarrollo de este proceso, lo cual nos permitió relacionar los cambios en moléculas pro-inflamatorias con lo observado durante el establecimiento de la condición en el PET. Este sistema depende del uso de moléculas con marcas radioactivas involucradas en procesos metabólicos, cuyo papel en este proceso puede ser monitoreado mediante el análisis de fotones que emiten al ser utilizadas en estos procesos.

En nuestros experimentos optamos por utilizar ¹⁸FDFG, un análogo de la glucosa que se utiliza para evaluar la actividad metabólica asociada a la captación de glucosa. En el momento que la ¹⁸FDFG es capturada por los transportadores de glucosa sucede la aniquilación del positrón de la marca de flúor, este evento produce la emisión de dos fotones de alta energía que pueden ser captados por el equipo de PET para generar los datos de captación (Buck & Reske, 2004).

Hasta ahora el uso de técnicas de imagen funcional como lo es el PET ha tenido un impacto limitado en el estudio de condiciones como los son infecciones, sepsis y choque séptico. En muchos casos, el uso de esta técnica está limitada como herramienta de apoyo para el diagnóstico cuando la fuente de la infección no tiene un origen conocido (Kluge et al., 2012; Sugawara et al., 1999). En estos estudios la ¹⁸FDFG sigue siendo el radiotrazador más utilizado, debido a que los cambios en la captación de esta molécula suelen observarse en focos donde existe inflamación asociada a la infiltración y activación de células del sistema inmune (Gotthardt et al., 2010).

En la investigación básica el uso de esta técnica para el estudio de estas patologías también ha sido bastante limitado. Similar al campo clínico, el PET se ha utilizado principalmente para el estudio del desarrollo de procesos infecciosos *in situ*. En este tipo de estudios se monitorea el desarrollo de focos de inflamación utilizando ¹⁸FDFG en prótesis contaminadas o sitios de infección inoculados experimentalmente (Odekerken et al., 2014; Via et al., 2012). Otro tipo de estudios en los que se ha

aprovechado el uso del PET es en aquellos en donde se monitorean cambios en la captación del radiomarcador en sistema nervioso central. Estos estudios están enfocados en asociar la disfunción cognitiva que ocurre durante la sepsis y el choque séptico con cambios de captación en regiones específicas del cerebro (Semmler et al., 2008). Sin embargo, este tipo de estudios limita el análisis a una región específica del organismo, lo cual conlleva una simplificación de las condiciones sepsis y choque séptico. En estas patologías el establecimiento de la disfunción multiorgánica es un evento determinante de la gravedad y tiene una especial importancia para el pronóstico, por lo que es necesario aprovechar este tipo de técnicas para el análisis simultáneo del desarrollo de estas condiciones en distintos órganos (Brown et al., 2006).

En nuestros experimentos estudiamos la región abdominal de los animales, ya que esta región fue seleccionada para obtener información de la captación de diversos órganos (hígado, riñones, intestino, estómago y bazo). El uso de ¹⁸FDFG como radiotrazador se debió a la captación ubicua de esta molécula en los tejidos, lo cual nos permitió definir un patrón normal de captación que sirvió de base para la comparación entre los distintos tratamientos.

En nuestros ensayos utilizamos conejos enanos, donde el principal motivo para la elección de este modelo fue la necesidad de adaptarse al sistema de MicroPET, el cual está diseñado para ser utilizado con animales pequeños como ratas y ratones. Además, el uso de estos animales nos permitió analizar un mayor número de órganos en el sistema de MicroPET (Ballado et al., 2010). En adición, la decisión de continuar utilizando al conejo como base para nuestro modelo de choque séptico busco mantener una mayor cercanía al ensayo que se había reportado previamente utilizando conejos Nueva Zelanda. Otra ventaja de este modelo es la similitud en el desarrollo del proceso de choque séptico en estos animales con respecto a los humanos, lo cual es una ventaja frente a los modelos murinos (Fink, 2014; Poli-de-Figueiredo et al., 2008; Wichterman et al, 1980). En nuestros estudios se utilizaron cuatro grupos experimentales: CONTROL, VSAK, LPS y VSAK+LPS. Siendo el principal objetivo de estos grupos analizar los efectos de VSAK sobre el modelo de choque séptico (grupo LPS).

El sistema de PET permitió apreciar cambios en la captación de ^{18}F FDG asociados a la administración de LPS, y estos efectos fueron atenuados por la administración del péptido VSAK en el grupo VSAK+LPS. Uno de los efectos más notorios fue la disminución de la captación del radiofármaco en algunos de los órganos analizados. Esta disminución se observó en los dos experimentos independientes, y no se vio afectado por el aumento de la dosis de LPS en el segundo experimento. Estas observaciones fueron confirmadas con el análisis cuantitativo de los datos de SUV e %ID/cc de ambos experimentos, los cuales corroboraron la disminución de la captación en los animales del grupo LPS y el efecto amortiguador observado en el grupo VSAK+LPS. A pesar de que las diferencias encontradas representaban un cambio relativamente pequeño en la captura del radiomarcador, estos siguen representando un evento importante en el contexto del organismo, algo común al considerar que una de las ventajas de las técnicas de imagen funcional es destacar variaciones muy pequeñas de la región de estudio. Un ejemplo de esto puede observarse en el uso de tomografía funcional para analizar cambios en la actividad cerebral en donde la diferencia entre una regiones activas e inactivas puede presentar un cambio de captación de apenas 5% (Ogawa et al., 1992).

Además de corroborar el patrón de captación observados en los grupos VSAK y VSAK+LPS, en el segundo experimento se observó otro efecto producido por la administración de LPS que también fue atenuado por VSAK. Este corresponde a un aumento en la captación de riñones presentada por el grupo LPS, el cual pudo observarse en los diferentes análisis realizados con los datos de captación. En el grupo LPS este efecto sobre los riñones se hizo más notable conforme avanzo el tiempo de captura y también pudo verse reflejado en los datos de captación total de estos órganos. De igual forma a lo observado en la disminución de la captación en órganos como hígado e intestino delgado, el efecto de los LPS fue atenuado por la administración de VSAK como se observa en los análisis de captación de estos órganos en el grupo VSAK+LPS. Este evento puede ser explicado por un incremento en la recaptura renal de glucosa para devolverla a la circulación, sin estar asociado a un cambio en la actividad metabólica en los riñones (Mather & Pollock, 2011).

Los cambios observados en la captación del radiotrazador indicaban una alteración en los mecanismos que regulan la entrada de glucosa en las células, el cual era producido por la administración de LPS. Esta alteración se confirmó al analizar el nivel en circulación de insulina y glucosa. A pesar de que el análisis del nivel de insulina indicó que no existían diferencias estadísticamente significativas, se observaron tendencias en esta molécula que están asociadas a los cambios de captación observados en el PET. Mientras que los grupos CONTROL y VSAK no presentaron grandes diferencias en el nivel de esta molécula, en el grupo LPS se observó un ligero incremento de Insulina en circulación. Como ha ocurrido en otros aspectos analizados, la administración de VSAK en el grupo VSAK+LPS atenuó el incremento en el nivel de insulina producido por los LPS. Cabe resaltar que el efecto de VSAK sobre el nivel de insulina en animales tratados con LPS fue congruente en los distintos experimentos de forma independiente a la dosis de LPS administrada. Además, el nivel de glucosa de estos animales presentó tendencias que indicaron una disfunción metabólica en el grupo LPS. Los grupos CONTROL y VSAK presentaron un nivel de glucosa dentro del rango normal, mientras que en el grupo LPS se observó un aumento importante en el nivel de glucosa aun a pesar del mayor nivel de insulina presente en estos animales. De forma consistente a lo observado en el nivel de insulina, el péptido VSAK aminoró este cambio en el grupo VSAK+LPS. El efecto observado en los niveles de glucosa e insulina, son indicadores de una disfunción del efecto de la insulina para promover la captación de glucosa por tejidos insulino-dependientes. Esto apoya lo observado en el análisis de PET de los riñones, en donde esta disfunción favorecería la acumulación de esta molécula en los riñones para ser recapturada. Estos efectos podrían asociarse al establecimiento de una condición similar a resistencia a la insulina (Carlson, 2003; Clemens et al., 1984; Clowes et al., 1978). Este efecto es congruente con lo observado en el ámbito clínico, donde la aparición transitoria de resistencia a la insulina es un evento característico de la sepsis y el choque séptico, (Marik & Raghavan, 2004). En adición, en la práctica clínica la aparición de hiperinsulinemia e hiperglicemia se asocian a una disfunción metabólica y son indicadores negativos para el pronóstico del individuo (Schetz et al., 2008). En sepsis y choque séptico, el

establecimiento de resistencia a la insulina se asocia a la producción de moléculas pro-inflamatorias cuyos efectos interfieren en la vía de señalización normal de esta la insulina (Lassenius et al., 2011; Mehta et al., 2010). Por ello fue necesario realizar el análisis de marcadores pro-inflamatorios buscando una asociación de cambios en el perfil inflamatorio que pudieran asociarse el desarrollo del estado similar a resistencia la insulina en nuestros animales (Nieto-Vazquez et al., 2008).

El análisis de moléculas pro-inflamatorias incluyó al TNFa, IL-1A, IL-1B, IL-8 (CXCL8), MIP-1B (CCL4), Leptina, NCAM (CD56) soluble y MMP-9. Estas moléculas intervienen en el desarrollo de la respuesta inflamatoria y están asociadas al desarrollo de choque séptico en distintos periodos de esta condición.

TNFa tiene un papel central en la respuesta que puede conducir a sepsis y choque séptico, además de estar directamente implicada en la respuesta del hospedero a los LPS mediada por el receptor TLR4 (Lu et al., 2008). En nuestros experimentos esta molécula presento una tendencia relacionada a lo observado en los análisis de PET, insulina y glucosa. Mientras que los grupos CONTROL y VSAK presentaron un nivel muy bajo de esta citocina, el grupo LPS mostró un incremento muy notable de esta molécula. Esto se observa de forma muy distintiva en el segundo experimento en donde el nivel de esta citocina fue casi treinta veces mayor al observado en los grupos CONTROL y VSAK. Esta citocina fue la más afectada por el péptido VSAK, en donde la administración del péptido mantuvo el nivel de esta molécula en un nivel cercano al de los grupos control. Además de esto, existen reportes en donde las acciones de esta molécula se asocian directamente con el desarrollo de resistencia a la insulina, por lo que esta molécula podría ser responsable del efecto de resistencia observado en nuestros animales (Hoareau et al., 2010; Moller, 2000; Shi et al., 2006).

Otra de las citocinas analizadas fue IL-1A la cual está asociada con el funcionamiento normal y remodelación de tejidos; siendo una molécula que es producida de forma constitutiva y liberada a la circulación. Sin embargo, el nivel de esta citocina también se ve modificado durante el desarrollo de un proceso inflamatorio (Di Paolo & Shayakhmetov, 2016; Garlanda et al., 2013). Esta molécula

presento un claro incremento en los grupos LPS y VSAK+LPS, sin cambios importantes en los grupos CONTROL y VSAK. Después del ajuste de la dosis de LPS, el incremento de esta molécula en el grupo LPS fue claramente notorio en comparación con los otros tres grupos.

IL-1B es una molécula con funciones análogas a IL-1A, la cual solo es liberada durante un proceso inflamatorio (Garlanda et al., 2013; Mizutani et al, 1991). El nivel de esta citocina presentó un comportamiento similar al de TNF en los distintos grupos. En los grupos CONTROL y VSAK esta citocina mostró los menores niveles, lo cual contrastó con el incremento que se presentó en el grupo LPS. Nuevamente se pudo observar un efecto de atenuación por parte de VSAK para esta citocina en el grupo VSAK+LPS.

Estas tres moléculas (TNF α , IL-1A e IL-1B) están involucradas en la fase temprana de la respuesta inflamatoria, por lo que son necesarias para el inicio y amplificación de la respuesta del hospedero (Barak et al., 1998., Cavaillon et al., 2003; Foëx et al., 1993). Los resultados del análisis de estas moléculas indican que la administración de VSAK atenúa su producción, sin generar un efecto de reversión completa en la producción de estas moléculas. Esto indica un efecto modulador de VSAK sobre el proceso inflamatorio temprano asociado al choque séptico

El análisis de MIP-1B e IL-8 busco el determinar el efecto de VSAK sobre estas quimiocinas, las cuales son producidas en una fase intermedia del choque séptico y están asociadas con la migración de células del sistema inmune a sitios de infección para promover la inflamación.

La quimiocina MIP-1B está involucrada en la migración de monocitos hacia focos de inflamación, los cuales se activan en estos sitios y promueven la inflamación mediante la producción de diversas moléculas (Menten et al., 2002). Esta molécula mantuvo las tendencias observadas con otros grupos, mostrando cambios interesantes en el grupo LPS y el grupo VSAK+LPS. En esta molécula el efecto neutralizador de VSAK solo pudo observarse cuando se incrementó la dosis de LPS a 450 ng/kg, y con esta dosis el grupo VSAK+LPS mostro una clara disminución de MIP-1B en comparación con el grupo LPS.

IL-8 es una quimiocina involucrada en la migración de neutrófilos, los cuales también favorecen el desarrollo del proceso inflamatorio en las fases tempranas (Hébert & Baker, 1993; Russo et al, 2014). El comportamiento de esta molécula fue muy parecido al observado en MIP-1B en los distintos experimentos, lo cual reafirma un efecto de VSAK para disminuir la liberación de quimiocinas. Los grupos CONTROL y VSAK mostraron los niveles más bajos de esta molécula, mientras que el grupo LPS presentó una elevación en el nivel de esta quimiocina comparado con estos grupos. En el grupo VSAK+LPS el incremento de la dosis de LPS permitió apreciar el efecto de neutralización de VSAK sobre la producción de esta molécula

El análisis de MIP-1B e IL-8 indican que la administración de VSAK tiene un efecto sobre la producción de estas quimiocinas, lo cual tendría un efecto modulador sobre la migración de células del sistema inmune. Este efecto también limitaría el desarrollo del proceso inflamatorio al disminuir el reclutamiento de células que favorecerían la inflamación (Adams et al., 2001; Kobayashi et al., 2006).

El análisis de marcadores pro-inflamatorios se completó con las moléculas Leptina, MMP-9 y NCAM-1 (CD56). A diferencia de las citocinas y quimiocinas analizadas previamente, estas moléculas están asociadas a una fase posterior del desarrollo del proceso inflamatorio

Leptina es una molécula implicada en procesos que regulan la ingesta de alimentos, los cuales pueden involucrar la producción de moléculas pro-inflamatorias con efecto anorexigenico. La liberación de esta molécula está ligada directamente a las acciones de la insulina (Otero et al., 2005). El análisis de Leptina en los animales indicó que no existen diferencias significativas o tendencias destacables entre los grupos, lo cual se observó en los dos distintos experimentos.

MMP9 es una proteasa que participa en la activación de diversas citocinas y quimiocinas, además de estar involucrada en el proceso de infiltración de neutrófilos (Dubois et al., 2002; Starckx et al., 2002). En nuestro primer experimento el nivel de esta proteasa no mostró cambios significativos entre los grupos, aunque pudo observarse un ligero aumento en el grupo LPS para esta molécula. Sin embargo,

este incremento no fue consistente en el segundo experimento en donde esta molécula presentó valores similares entre grupos.

La forma soluble de NCAM-1 es un marcador de células *Natural Killers*, que en fases avanzadas de la sepsis y choque séptico se ha asociado la forma soluble de esta molécula como un indicador de la disfunción del sistema inmune (Kumar, 2018; Van Acker et al, 2017). Esta molécula no mostró cambios significativos en los animales de los distintos experimentos, y tampoco fue observada alguna tendencia similar a la que presentaron otros marcadores pro-inflamatorios.

El análisis de esta últimas tres moléculas no mostró cambios o tendencias importantes entre los diversos grupos, lo cual puede deberse a la asociación de esta moléculas a fases tardías de las sepsis y el choque séptico (Ramnath et al., 2006). Algo previsible al considerar que nuestro modelo, el cual replica una forma aguda y severa de sepsis o choque séptico.

Considerando los resultados de los diferentes aspectos analizados en este proyecto, asumimos la validez del modelo que utilizamos para reproducir la condición de choque séptico. Este modelo nos permitió mantener las ventajas que presenta el uso de conejos, añadiendo la capacidad para realizar estudios de imagen funcional para monitorear el desarrollo del estado de esta condición (Bárcena-Varela et al., 2017). Además, el desarrollo de hipotermia observado en nuestro modelo de choque séptico, junto con el deterioro en la condición general de estos animales, también pueden considerarse buenos indicadores del establecimiento de la condición que buscamos reproducir (Singer et al., 2016).

La incorporación del PET en este estudio cumplió su función al permitirnos caracterizar efectos en la captación del radiotrazador asociados al desarrollo de choque séptico, las cuales pueden ser explicados por eventos caracterizados en el desarrollo del choque séptico. Sin embargo, la inducción de esta condición mediante la administración directa de LPS solo reproduce algunos de los eventos involucrados en el desarrollo de sepsis y choque séptico, esto plantea la necesidad de expandir la capacidad de este modelo para reproducir estas patologías (Rittirsch, Hoesel, & Ward, 2007). Lo cual debería considerar la generación de modelos que

reproduzcan estas condiciones a través de otros procedimientos, como son el uso de partículas bacterianas o bacterias atenuadas, modelos de sepsis polimicrobiana por punción cecal o modelos de administración intravenosa de unidades formadoras de colonias. Esto permitiría ampliar la información del desarrollo de estas condiciones aprovechando diversos modelos que mimetizan diferentes formas de sepsis y choque séptico.

Finalmente, nuestro modelo nos permitió determinar el efecto benéfico de la administración del péptido VSAK en condiciones de sepsis y choque séptico. La capacidad del péptido VSAK para reducir los efectos de la administración de LPS fue confirmado de forma consistente en los distintos experimentos de PET. Además, se observó que el tratamiento de VSAK previno los cambios en el nivel de glucosa e insulina producidos por la administración de LPS. los cuales pudieron ser relacionados al efecto observado en el PET.

Aunado a estos efectos, el tratamiento con el péptido VSAK tuvo un efecto de atenuación sobre diversos marcadores pro-inflamatorios, principalmente en aquellos que se producen en las fases tempranas del proceso inflamatorio. Algo destacable del efecto de VSAK, es la propiedad de no suprimir por completo el desarrollo de la respuesta inflamatoria (Delano & Ward, 2016a; Hilchie et al., 2013; Mookherjee & Hancock, 2007). Esto puede observarse en los resultados de distintas citocinas en los animales del grupo VSAK+LPS, en donde se observa que la administración de VSAK evita un incremento drástico de estas moléculas. Este efecto modulador mostrado por el péptido VSAK, adquiere especial importancia al considerar que algunos tratamientos experimentales sepsis y choque séptico. los cuales han fallado en fases clínicas debido a presentar características inmunosupresoras (Cohen et al., 2015). En estos estudios, a pesar de que estas moléculas eran capaces de prevenir el desarrollo del proceso inflamatorio durante sepsis o choque séptico, este efecto a su vez evitaba una correcta respuesta ante la infección; ejemplo de esto han sido pruebas clínicas con anticuerpos neutralizadores o receptores señuelos para citocinas como TNFa o IL-1A. La capacidad inmunosupresora de este tipo de moléculas limita su aplicabilidad debido

a los efectos deletéreos que pueden llegar a causar en los individuos (Brown et al., 2006; Cohen & Carlet, 1996; Opal et al., 1997).

El efecto neutralizador del péptido VSAK plantea la posibilidad del uso de esta molécula como un agente que pudiera ser administrado durante un proceso infeccioso en conjunto con los tratamientos tradicionales. Lo cual buscaría prevenir el desarrollo de estados de sepsis y choque séptico, sin afectar la correcta resolución del proceso infeccioso subyacente. (Bárcena-Varela et al., 2017; Brandenburg et al., 2016) Sin embargo, existen aspectos que es necesario aclarar sobre el mecanismo molecular por el cual VSAK produce los efectos observados, sin descartar la posibilidad de que algunos de los efectos observados estén directamente asociados a efectos del péptido, fuera del contexto de la capacidad de VSAK para unir y neutralizar LPS.

10. Conclusiones

El conejo enano es un modelo adecuado para el estudio de proceso de sepsis y choque séptico. Nuestro modelo presenta indicadores asociados al desarrollo de estas patologías, como son el deterioro del estado general, hipotermia, cambios en la producción de marcadores pro-inflamatorios y un estado similar a resistencia a la insulina. Además, este modelo mantiene las ventajas del uso del conejo sobre los modelos murinos, debido a que en estos animales el desarrollo de los procesos de sepsis y choque séptico presentan mayor similitud al observado en humanos. En adición, el uso de este animal permite aprovechar nuevas técnicas para el análisis que facilitan el análisis simultaneo de múltiples órganos, como lo es el sistema de PET.

El sistema de PET permite monitorear el desarrollo de choque séptico inducido por la administración de LPS. Mediante el uso de esta técnica pudimos diferenciar cualitativa y cuantitativamente el establecimiento de esta condición, asociado con cambios producidos en la captación de la marca radioactiva. Estos efectos en la captación están asociados a procesos que ocurren durante la sepsis y el choque séptico, y pueden ser explicados por cambios observados en el análisis de moléculas involucradas en el desarrollo de choque séptico.

La administración del péptido VSAK neutraliza el efecto producido por los LPS, evitando el desarrollo de la condición de choque séptico. Este efecto neutralizador se VSAK pudo ser observado a través de los distintos análisis realizados. En los resultados de PET se puede observar que la administración del péptido previene los cambios en la captación asociados a los LPS. Además de evitar el establecimiento del estado similar a resistencia la insulina observado en los animales. Finalmente, el péptido VSAK tiene un efecto modulador sobre la producción moléculas pro-inflamatorias, principalmente en aquellos principalmente en aquellas producidas en la fase temprana de esta patología.

11. Perspectivas

En diferentes ensayos realizados se ha demostrado que la administración del péptido VSAK tiene un efecto neutralizador que evita el desarrollo del choque séptico en *in vivo*. Este efecto plantea la posibilidad de utilizar al péptido VSAK como un agente terapéutico en condiciones de sepsis y choque séptico.

Sin embargo, antes de plantear el uso de este péptido en ámbito clínico existen algunos aspectos de VSAK que es necesario dilucidar. Uno de estos es la forma en que este interactúa con el organismo una vez que es administrado, por lo que será necesario realizar los ensayos que permitan determinar los parámetros farmacocinéticos, farmacodinámicos y de distribución del péptido. Además, aún existen aspectos a explorar sobre el mecanismo molecular de VSAK que expliquen el mecanismo de unión con los LPS, así como los efectos que éste produce tras en su administración *in vivo*.

También es necesario determinar los efectos del péptido VSAK en modelos de sepsis y choque séptico distintos a los que hemos utilizado. Esto nos permitirá dilucidar el efecto de VSAK en modelos que reproducen otros aspectos de estas patologías. Estos modelos permitirían explorar aspectos de la administración terapéutica del péptido en un proceso infeccioso y durante los distintos estadios hasta llegar al choque séptico, lo que permitiría generar una estrategia para la aplicación clínica del péptido VSAK.

12. Bibliografía

- Adams, J. M., Hauser, C. J., Livingston, D. H., Lavery, R. F., Fekete, Z., & Deitch, E. A. (2001). Early trauma polymorphonuclear neutrophil responses to chemokines are associated with development of sepsis, pneumonia, and organ failure. *The Journal of Trauma*, *51*(3), 452–456; discussion 456-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11535890>
- Alonso, A. L., Zentella-Dehesa, A., & Mas-Oliva, J. (2003). Characterization of a naturally occurring new version of the cholesterol ester transfer protein (CETP) from small intestine. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *245*(1–2), 173–182. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12708757>
- Angus, D. C., & van der Poll, T. (2013). Severe Sepsis and Septic Shock. *New England Journal of Medicine*, *369*(9), 840–851. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1208623>
- Ballado, F. T., López, N. O., Flores, R. O., & Rodríguez, M. A. A. (2010). *Evaluación de desempeño del micropet focus con los radionúclidos C11, N13 y F18. Revista Mexicana de Física* (Vol. 56). Sociedad Mexicana de Física. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0035-001X2010000600008
- Barak, V., Schwartz, A., Kalickman, I., Nisman, B., Gurman, G., & Shoenfeld, Y. (1998). Prevalence of Hypophosphatemia in Sepsis and Infection: The Role of Cytokines. *The American Journal of Medicine*, *104*(1), 40–47. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(97\)00275-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(97)00275-1)
- Bárcena-Varela, S., Martínez-de-Tejada, G., Martín, L., Schuerholz, T., Gil-Royo, A. G., Fukuoka, S., ... Heinbockel, L. (2017). Coupling killing to neutralization: combined therapy with ceftriaxone/Pep19-2.5 counteracts sepsis in rabbits. *Experimental & Molecular Medicine*, *49*(6), e345. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.75>
- Beamer, L J, Carroll, S. F., & Eisenberg, D. (1997). Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution. *Science (New York,*

N.Y.), 276(5320), 1861–1864. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9188532>

Beamer, Lesa J., Carroll, S. F., & Eisenberg, D. (2008). The BPI/LBP family of proteins: A structural analysis of conserved regions. *Protein Science*, 7(4), 906–914. <https://doi.org/10.1002/pro.5560070408>

Beutler, B., & Rietschel, E. T. (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology*, 3(2), 169–176. <https://doi.org/10.1038/nri1004>

Bingle, C. D., & Craven, C. J. (2002). PLUNC: A novel family of candidate host defence proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. *Human Molecular Genetics*, 11(8), 937–943. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.8.937>

Bingle, Colin D., & Craven, C. J. (2004). Meet the relatives: a family of BPI- and LBP-related proteins. *Trends in Immunology*, 25(2), 53–55. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2003.11.007>

Brandenburg, K., Heinbockel, L., Correa, W., & Lohner, K. (2016). Peptides with dual mode of action: Killing bacteria and preventing endotoxin-induced sepsis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(5), 971–979. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.01.011>

Brown, K., Brain, S., Pearson, J., Edgeworth, J., Lewis, S., & Treacher, D. (2006). Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *The Lancet*, 368(9530), 157–169. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69005-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69005-3)

Buck, A. K., & Reske, S. N. (2004). Cellular origin and molecular mechanisms of 18F-FDG uptake: is there a contribution of the endothelium? *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 45(3), 461–463. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001688>

Carlson, G. L. (2003). Insulin resistance in sepsis. *British Journal of Surgery*, 90(3), 259–260. <https://doi.org/10.1002/bjs.4081>

Cavaillon, J., Adib-conquy, M., Fitting, C., Adrie, C., & Payen, D. (2003). Cytokine

- Cascade in Sepsis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 35(9), 535–544. <https://doi.org/10.1080/00365540310015935>
- Cecconi, M., Evans, L., Levy, M., & Rhodes, A. (2018). Sepsis and septic shock. *Lancet (London, England)*, 392(10141), 75–87. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30696-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30696-2)
- Clemens, M. G., Chaudry, I. H., Daigneau, N., & Baue, A. E. (1984). Insulin resistance and depressed gluconeogenic capability during early hyperglycemic sepsis. *The Journal of Trauma*, 24(8), 701–708. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6381745>
- Clowes, G. H. A., Martin, H., Walji, S., Hirsch, E., Gazitua, R., & Goodfellow, R. (1978). Blood insulin responses to blood glucose levels in high output sepsis and septic shock. *The American Journal of Surgery*, 135(4), 577–583. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(78\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0002-9610(78)90040-5)
- Cohen, J., & Carlet, J. (1996). INTERSEPT: an international, multicenter, placebo-controlled trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor-alpha in patients with sepsis. International Sepsis Trial Study Group. *Critical Care Medicine*, 24(9), 1431–1440. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8797612>
- Cohen, Jonathan, Vincent, J.-L., Adhikari, N. K. J., Machado, F. R., Angus, D. C., Calandra, T., ... Pelfrene, E. (2015). Sepsis: a roadmap for future research. *The Lancet Infectious Diseases*, 15(5), 581–614. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70112-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70112-X)
- Delano, M. J., & Ward, P. A. (2016a). Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? *Journal of Clinical Investigation*, 126(1), 23–31. <https://doi.org/10.1172/JCI82224>
- Delano, M. J., & Ward, P. A. (2016b). The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunological Reviews*, 274(1), 330–353. <https://doi.org/10.1111/imr.12499>

- Dentener, M. A., Von Asmuth, E. J., Francot, G. J., Marra, M. N., & Buurman, W. A. (1993). Antagonistic effects of lipopolysaccharide binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein on lipopolysaccharide-induced cytokine release by mononuclear phagocytes. Competition for binding to lipopolysaccharide. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *151*(8), 4258–4265. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8409400>
- Devi Ramnath, R., Weing, S., He, M., Sun, J., Zhang, H., Singh Bawa, M., & Bhatia, M. (2006). Inflammatory mediators in sepsis: Cytokines, chemokines, adhesion molecules and gases. *Journal of Organ Dysfunction*, *2*(2), 80–92. <https://doi.org/10.1080/17471060500435662>
- Di Paolo, N. C., & Shayakhmetov, D. M. (2016). Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nature Immunology*, *17*(8), 906–913. <https://doi.org/10.1038/ni.3503>
- Drayna, D., Jarnagin, A. S., McLean, J., Henzel, W., Kohr, W., Fielding, C., & Lawn, R. (1987). Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA. *Nature*, *327*(6123), 632–634. <https://doi.org/10.1038/327632a0>
- Dubois, B., Starckx, S., Pagenstecher, A., Oord, J. van den, Arnold, B., & Opdenakker, G. (2002). Gelatinase B deficiency protects against endotoxin shock. *European Journal of Immunology*, *32*(8), 2163. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200208\)32:8<2163::AID-IMMU2163>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200208)32:8<2163::AID-IMMU2163>3.0.CO;2-Q)
- Eckert, J. K., Kim, Y. J., Kim, J. I., Gürtler, K., Oh, D.-Y., Sur, S., ... Schumann, R. R. (2013). The Crystal Structure of Lipopolysaccharide Binding Protein Reveals the Location of a Frequent Mutation that Impairs Innate Immunity. *Immunity*, *39*(4), 647–660. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2013.09.005>
- Fink, M. P. (2014). Animal models of sepsis. *Virulence*, *5*(1), 143–153. <https://doi.org/10.4161/viru.26083>
- Foëx, B. A., Lamb, W. R., Roberts, T. E., Brear, S. G., Macartney, I., Hammer, M., & Brenchley, P. E. C. (1993). Early cytokine response to multiple injury. *Injury*, *24*(6), 373–376. [https://doi.org/10.1016/0020-1383\(93\)90098-Q](https://doi.org/10.1016/0020-1383(93)90098-Q)

- García-González, V., Gutiérrez-Quintanar, N., & Mas-Oliva, J. (2015). The C-terminal Domain Supports a Novel Function for CETPI as a New Plasma Lipopolysaccharide-Binding Protein. *Scientific Reports*, 5, 16091. <https://doi.org/10.1038/srep16091>
- García-González, V., & Mas-Oliva, J. (2013). Amyloid fibril formation of peptides derived from the C-terminus of CETP modulated by lipids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 434(1), 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.067>
- Garlanda, C., Dinarello, C. A., & Mantovani, A. (2013). The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity*, 39(6), 1003–1018. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2013.11.010>
- Gentile, L. F., & Moldawer, L. L. (2013). DAMPs, PAMPs, and the origins of SIRS in bacterial sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)*, 39(1), 113–114. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318277109c>
- Ghafouri, B., Kihlström, E., Tagesson, C., & Lindahl, M. (2004). PLUNC in human nasal lavage fluid: multiple isoforms that bind to lipopolysaccharide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1699(1–2), 57–63. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2004.01.001>
- Gotthardt, M., Bleeker-Rovers, C. P., Boerman, O. C., & Oyen, W. J. G. (2010). Imaging of inflammation by PET, conventional scintigraphy, and other imaging techniques. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 51(12), 1937–1949. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.076232>
- Gutsmann, T., Muller, M., Carroll, S. F., MacKenzie, R. C., Wiese, A., & Seydel, U. (2001). Dual Role of Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Protein in Neutralization of LPS and Enhancement of LPS-Induced Activation of Mononuclear Cells. *Infection and Immunity*, 69(11), 6942–6950. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.11.6942-6950.2001>
- Hancock, R. E. W., Haney, E. F., & Gill, E. E. (2016). The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nature Reviews Immunology*,

16(5), 321–334. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.29>

Hancock, R. E. W., & Sahl, H.-G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies Hancock, R. E. W., & Sahl, H.-G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24(12), 1551–1557. [htt. *Nature Biotechnology*, 24\(12\), 1551–1557. https://doi.org/10.1038/nbt1267](http://doi.org/10.1038/nbt1267)

Hancock, R E, & Lehrer, R. (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 16(2), 82–88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9487736>

Hancock, Robert EW. (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases*, 1(3), 156–164. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00092-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00092-5)

Hébert, C. A., & Baker, J. B. (1993). Interleukin-8: A Review. *Cancer Investigation*, 11(6), 743–750. <https://doi.org/10.3109/07357909309046949>

Hilchie, A. L., Wuerth, K., & Hancock, R. E. W. (2013). Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nature Chemical Biology*, 9(12), 761–768. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1393>

Hoareau, L., Bencharif, K., Rondeau, P., Murumalla, R., Ramanan, P., Tallet, F., ... Festy, F. (2010). Signaling pathways involved in LPS induced TNFalpha production in human adipocytes. *Journal of Inflammation (London, England)*, 7, 1. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-7-1>

Jackson, J. J., & Kropp, H. (1992). ss-Lactam Antibiotic-Induced Release of Free Endotoxin: In Vitro Comparison of Penicillin-Binding Protein (PBP) 2-Specific Imipenem and PBP 3-Specific Ceftazidime. *Journal of Infectious Diseases*, 165(6), 1033–1041. <https://doi.org/10.1093/infdis/165.6.1033>

Jaime Mas Oliva, Nadia Gutiérrez Quintanar, V. G. G. G. (2014). *PCT/MX2014/000087 ; WO2015190903A1*. Mexico.

- Jerala, R. (2007). Structural biology of the LPS recognition. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(5), 353–363. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2007.04.001>
- Kaconis, Y., Kowalski, I., Howe, J., Brauser, A., Richter, W., Razquin-Olazarán, I., ... Brandenburg, K. (2011). Biophysical mechanisms of endotoxin neutralization by cationic amphiphilic peptides. *Biophysical Journal*, 100(11), 2652–2661. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.04.041>
- Kluge, S., Braune, S., Nierhaus, A., Wichmann, D., Derlin, T., Mester, J., & Klutmann, S. (2012). Diagnostic value of positron emission tomography combined with computed tomography for evaluating patients with septic shock of unknown origin. *Journal of Critical Care*, 27(3), 316.e1-316.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2011.10.004>
- Kobayashi, M., Tsuda, Y., Yoshida, T., Takeuchi, D., Utsunomiya, T., Takahashi, H., & Suzuki, F. (2006). Bacterial sepsis and chemokines. *Current Drug Targets*, 7(1), 119–134. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16454704>
- Krasity, B. C., Troll, J. V, Weiss, J. P., & McFall-Ngai, M. J. (2011). LBP/BPI proteins and their relatives: conservation over evolution and roles in mutualism. *Biochemical Society Transactions*, 39(4), 1039–1044. <https://doi.org/10.1042/BST0391039>
- Kumar, V. (2018). Natural killer cells in sepsis: Underprivileged innate immune cells. *European Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/J.EJCB.2018.12.003>
- Lassenius, M. I., Pietiläinen, K. H., Kaartinen, K., Pussinen, P. J., Syrjänen, J., Forsblom, C., ... Lehto, M. (2011). Bacterial Endotoxin Activity in Human Serum Is Associated With Dyslipidemia, Insulin Resistance, Obesity, and Chronic Inflammation. *Diabetes Care*, 34, 1809–1815. <https://doi.org/10.2337/dc10-2197>
- Levy, O. (2000). Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. *Blood*, 96(8), 2664–2672. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11023496>

- Lilley, E., Armstrong, R., Clark, N., Gray, P., Hawkins, P., Mason, K., ... Nandi, M. (2015). Refinement of Animal Models of Sepsis and Septic Shock. *Shock*, 43(4), 304–316. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000318>
- López-Bojórquez, L. N., Dehesa, A. Z., Reyes-Terán, G., Matzinger, P., MM, F. M. L., Marshall, J. C., ... Cross, A. S. (2002). Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock. *Archives of Medical Research*, 35(6), 465–479. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2004.07.006>
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2008.01.006>
- Marik, P. E., & Raghavan, M. (2004). Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis. *Intensive Care Medicine*, 30(5), 748–756. <https://doi.org/10.1007/s00134-004-2167-y>
- Mather, A., & Pollock, C. (2011). Glucose handling by the kidney. *Kidney International*, 79, S1–S6. <https://doi.org/10.1038/KI.2010.509>
- Mehta, N. N., McGillicuddy, F. C., Anderson, P. D., Hinkle, C. C., Shah, R., Pruscino, L., ... Reilly, M. P. (2010). Experimental endotoxemia induces adipose inflammation and insulin resistance in humans. *Diabetes*, 59(1), 172–181. <https://doi.org/10.2337/db09-0367>
- Menten, P., Wuyts, A., & Van Damme, J. (2002). Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13(6), 455–481. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12401480>
- Mizutani, H., Schechter, N., Lazarus, G., Black, R. A., & Kupper, T. S. (1991). Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 beta (IL-1 beta) to an active IL-1 species by human mast cell chymase. *The Journal of Experimental Medicine*, 174(4), 821–825. <https://doi.org/10.1084/JEM.174.4.821>
- Moller, D. E. (2000). Potential Role of TNF- α in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 11(6),

212–217. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(00\)00272-1](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(00)00272-1)

Mookherjee, N., & Hancock, R. E. W. (2007). Cationic host defence peptides: Innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *64*(7–8), 922–933. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6475-6>

Nieto-Vazquez, I., Fernández-Veledo, S., Krämer, D. K., Vila-Bedmar, R., Garcia-Guerra, L., & Lorenzo, M. (2008). Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Archives of Physiology and Biochemistry*, *114*(3), 183–194. <https://doi.org/10.1080/13813450802181047>

Odekerken, J. C. E., Brans, B. T., Welting, T. J. M., & Walenkamp, G. H. I. M. (2014). (18)F-FDG microPET imaging differentiates between septic and aseptic wound healing after orthopedic implant placement: a longitudinal study of an implant osteomyelitis in the rabbit tibia. *Acta Orthopaedica*, *85*(3), 305–313. <https://doi.org/10.3109/17453674.2014.900894>

Ogawa, S., Tank, D. W., Menon, R., Ellermann, J. M., Kim, S. G., Merkle, H., & Ugurbil, K. (1992). Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(13), 5951–5955. <https://doi.org/10.1073/PNAS.89.13.5951>

Opal, S. M., Fisher, C. J., Dhainaut, J. F., Vincent, J. L., Brase, R., Lowry, S. F., ... Seneff, M. (1997). Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Critical Care Medicine*, *25*(7), 1115–1124. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9233735>

Otero, M., Lago, R., Lago, F., Casanueva, F. F., Dieguez, C., Gómez-Reino, J. J., & Gualillo, O. (2005). Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS Letters*, *579*(2), 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.024>

- Pastelin-Palacios, R., Gil-Cruz, C., Pérez-Shibayama, C. I., Moreno-Eutimio, M. A., Cervantes-Barragán, L., Arriaga-Pizano, L., ... López-Macías, C. (2011). Subversion of innate and adaptive immune activation induced by structurally modified lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium*. *Immunology*, *133*(4), 469–481. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03459.x>
- Poli-de-Figueiredo, L. F., Garrido, A. G., Nakagawa, N., & Sannomiya, P. (2008). EXPERIMENTAL MODELS OF SEPSIS AND THEIR CLINICAL RELEVANCE. *Shock*, *30*(Suppl 1), 53–59. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318181a343>
- Pop-Began, V., Păunescu, V., Grigorean, V., Pop-Began, D., & Popescu, C. (2014). Molecular mechanisms in the pathogenesis of sepsis. *Journal of Medicine and Life*, (Spec Iss 2), 38–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25870671>
- Qiu, X., Mistry, A., Ammirati, M. J., Chrnyk, B. A., Clark, R. W., Cong, Y., ... Seddon, A. P. (2007). Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules. *Nature Structural & Molecular Biology*, *14*(2), 106–113. <https://doi.org/10.1038/nsmb1197>
- Rittirsch, D., Flierl, M. A., & Ward, P. A. (2008). Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nature Reviews Immunology*, *8*(10), 776–787. <https://doi.org/10.1038/nri2402>
- Rittirsch, D., Hoesel, L. M., & Ward, P. A. (2007). The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *Journal of Leukocyte Biology*, *81*(1), 137–143. <https://doi.org/10.1189/jlb.0806542>
- Russo, R. C., Garcia, C. C., Teixeira, M. M., & Amaral, F. A. (2014). The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Review of Clinical Immunology*, *10*(5), 593–619. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.894886>
- Schetz, M., Vanhorebeek, I., Wouters, P. J., Wilmer, A., & Berghe, G. Van den. (2008). Tight Blood Glucose Control Is Renoprotective in Critically Ill Patients. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, *19*(3), 571.

<https://doi.org/10.1681/ASN.2006101091>

Schumann, R. R., Leong, S. R., Flaggs, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., ... Ulevitch, R. J. (1990). Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science (New York, N.Y.)*, *249*(4975), 1429–1431. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2402637>

Scott, M. G., Vreugdenhil, A. C., Buurman, W. A., Hancock, R. E., & Gold, M. R. (2000). Cutting edge: cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *164*(2), 549–553. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10623792>

Semmler, A., Hermann, S., Mormann, F., Weberpals, M., Paxian, S. A., Okulla, T., ... Heneka, M. T. (2008). Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. *Journal of Neuroinflammation*, *5*(1), 38. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-38>

Shen, Y., Maupetit, J., Derreumaux, P., & Tufféry, P. (2014). Improved PEP-FOLD Approach for Peptide and Miniprotein Structure Prediction. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *10*(10), 4745–4758. <https://doi.org/10.1021/ct500592m>

Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., & Flier, J. S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid–induced insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(11), 3015–3025. <https://doi.org/10.1172/JCI28898>

Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., ... Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, *315*(8), 801. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>

Starckx, S., Van den Steen, P. E., Wuyts, A., Van Damme, J., & Opdenakker, G. (2002). Neutrophil Gelatinase B and Chemokines in Leukocytosis and Stem Cell Mobilization. *Leukemia & Lymphoma*, *43*(2), 233–241. <https://doi.org/10.1080/10428190290005982>

- Sugawara, Y., Gutowski, T. D., Fisher, S. J., Brown, R. S., & Wahl, R. L. (1999). Uptake of positron emission tomography tracers in experimental bacterial infections: a comparative biodistribution study of radiolabeled FDG, thymidine, L-methionine, ⁶⁷Ga-citrate, and ¹²⁵I-HSA. *European Journal of Nuclear Medicine*, 26(4), 333–341. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10199938>
- Tsujimoto, H., Ono, S., Efron, P. A., Scumpia, P. O., Moldawer, L. L., & Mochizuki, H. (2007). ROLE OF TOLL-LIKE RECEPTORS IN THE DEVELOPMENT OF SEPSIS. *Shock*, 1. <https://doi.org/10.1097/shk.0b013e318157ee55>
- Van Acker, H. H., Capsomidis, A., Smits, E. L., & Van Tendeloo, V. F. (2017). CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? *Frontiers in Immunology*, 8, 892. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00892>
- Van Amersfoort, E. S., Van Berkel, T. J. C., & Kuiper, J. (2003). Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 379–414. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.379-414.2003>
- Via, L. E., Schimel, D., Weiner, D. M., Dartois, V., Dayao, E., Cai, Y., ... Barry, C. E. (2012). Infection dynamics and response to chemotherapy in a rabbit model of tuberculosis using [¹⁸F]2-fluoro-deoxy-D-glucose positron emission tomography and computed tomography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(8), 4391–4402. <https://doi.org/10.1128/AAC.00531-12>
- Weiss, J. (2003). Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria. *Biochemical Society Transactions*, 31(Pt 4), 785–790. <https://doi.org/10.1042/>
- Wichterman, K. A., Baue, A. E., & Chaudry, I. H. (1980). Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. *Journal of Surgical Research*, 29(2), 189–201. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(80\)90037-2](https://doi.org/10.1016/0022-4804(80)90037-2)
- Wimley, W. C., & Hristova, K. (2011). Antimicrobial peptides: successes, challenges

and unanswered questions. *The Journal of Membrane Biology*, 239(1–2), 27–34. <https://doi.org/10.1007/s00232-011-9343-0>

Zhang, L., & Gallo, R. L. (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology*, 26(1), R14–R19. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2015.11.017>