



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Instituto de Biotecnología

Papel inmunológico de péptidos antimicrobianos en infecciones sistémicas en modelos animales

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

MARCO ANTONIO IBARRA VALENCIA

DR. GERARDO CORZO BURGUETE

[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dr. Gustavo Pedraza

[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dr. Pavel Espino

[Universidad Autónoma de Chihuahua](#)

Cuernavaca, Morelos. Noviembre, 2022



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.

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Gerardo A. Corzo Burguete, miembro del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM).

Esta investigación fue realizada gracias al financiamiento de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), número IT200321, y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) al proyecto de investigación denominado "Venenos y antivenenos", número 303045.

También se contó con el apoyo del "Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado" (PAEP) para asistir al XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología en Santiago de Chile y para realizar una estancia de investigación en la Freie Universität de Berlín.

Jurado de Examen

Dra. María Angélica Santana Calderón

Dra. Constance Genevieve Jeanne Henriette Auvynet

Dra. Silvia Andrea Moreno Mendieta

Dr. Ricardo Oropeza Navarro

Dr. Edmundo Calva Mercado

*a mi mamá, mi papá, mi hermana
y mis abuelos,
mirar las ruedas
es como volver a empezar*

Contenido

1.Abreviaturas	1
2.Resumen	2
3.Introducción	3
Respuesta inmunitaria innata	3
Respuesta inflamatoria y el reconocimiento de patógenos	4
Péptidos antimicrobianos o de defensa de huésped	6
Efecto de los péptidos de defensa sobre la respuesta inmune	8
Infección y respuesta inmune por <i>Salmonella</i> Typhimurium	10
4.Antecedentes	12
Antimicrobianos provenientes de veneno de alacrán	12
Antimicrobianos desarrollados en el laboratorio	13
5.Justificación	16
6.Hipótesis	16
7.Objetivo	16
8.Objetivos particulares	16
9.Estrategia experimental	17
Condiciones de crecimiento de la cepa bacteriana y línea celular	17
Modelos animales	17
Ensayos de viabilidad celular	17
Ensayo de concentración mínima inhibitoria	18
Determinación de efecto bactericida	19
Estimulación de fagocitosis	19
Modelo de infección gástrica	20
Cuantificación de bacterias en heces	21
Determinación de perfiles de citocinas	21

Acción combinada de los péptidos _____	22
Efecto de la mezcla de péptidos sobre la viabilidad de macrófagos _____	22
Análisis estadístico _____	23
10.Resultados _____	24
Actividad in vitro de FA1 _____	24
FA1 influye en la viabilidad de macrófagos y de Salmonella Typhimurium _____	24
FA1 influye en los perfiles de expresión de citocinas de los macrófagos _____	27
Actividad in vivo de FA1 _____	30
FA1 decrece la infección gastrointestinal por Salmonella Typhimurium _____	30
FA1 modifica el perfil de expresión de citocinas en plasma de ratones infectados con Salmonella Typhimurium _____	31
Actividad in vitro de Pin2[G] _____	33
Pin2[G] influye en la viabilidad de macrófagos y de S. Typhimurium _____	33
La actividad fagocítica y bactericida de los macrófagos es influenciada por Pin2[G] _____	34
Pin2[G] influye en los perfiles de expresión de citocinas de macrófagos RAW264.7 _____	36
Actividad in vivo de Pin2[G] _____	39
Pin2[G] decrece la infección gastrointestinal por Salmonella Typhimurium _____	39
Pin2[G] modifica el perfil de expresión de citocinas en plasma de ratones infectados con Salmonella Typhimurium _____	40
Uso en conjunto de Pin2[G] y FA1 _____	41
La mezcla de FA1 y Pin2[G] tiene efecto aditivo contra el crecimiento de S. Typhimurium _____	41
La mezcla de los péptidos no interfiere en la viabilidad de los macrófagos _____	42
11. Discusión _____	44
12. Conclusiones _____	59
13. Perspectivas _____	60
14.Bibliografía _____	61

Abreviaturas

Abreviaturas	Significado
PAM	Péptido antimicrobiano
PDH	Péptido de defensa del huésped
MIC	Concentración mínima inhibitoria
TLR	Receptor tipo Toll
NLR	Receptor tipo NOD
SFBi	Suero fetal bovino inactivado
DMSO	Dimetil sulfóxido
MH	Mueller-Hinton
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácido lipoteicoico
IL	Interleucina
TNF	Factor de necrosis tumoral
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
IFN	Interferón
HBD	Beta-defensina humana
LBP	Proteína de unión a LPS
ATCC	American Type Culture Collection
MDR	Multidrogo resistente
XLD	Xilosa-Lisina desoxicolato
BMDM	Macrófagos derivados de médula ósea
µg	microgramo
mL	mililitro
h	hora
mg	miligramo
kg	kilogramo
CBA	Cytometric bead array
HBE	Epitelio bronquial humano
DO	Densidad óptica
nm	nanómetros
CFX	Ceftriaxona
UFC	Unidades formadoras de colonia
FIC	Concentración inhibitoria fraccional

1. Resumen

La búsqueda de nuevas moléculas antimicrobianas para tratar infecciones por bacterias multidrogo resistentes ha llevado a explorar fuentes ricas en moléculas de interés biológico, como el veneno de alacranes. En este se han encontrado una gran cantidad de péptidos antimicrobianos, PAM. Estos son, generalmente, cadenas cortas de aminoácidos, ricos en residuos hidrofóbicos e hidrofílicos y de carga positiva, aunque también existen péptidos aniónicos que cuentan con características diferentes. Los PAM hallados en la naturaleza pueden ser modificados a nivel estructural para incrementar su efecto antimicrobiano y disminuir los efectos negativos que puedan tener. En nuestro laboratorio se desarrollaron los péptidos, derivados de veneno de alacrán, Pin2[G] y FA1. Ambos son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas *in vitro* e *in vivo*. Además de que estimulan la expresión de receptores inmunitarios y de citocinas inflamatorias. Es por esto que se probó su efecto antimicrobiano e inmunomodulador en modelos de infección gástrica por *Salmonella* Typhimurium.

De esta forma, observamos que FA1 inhibe el crecimiento de *S. Typhimurium* y estimula la fagocitosis junto con el efecto bactericida de macrófagos RAW264.7. Además, promueve la expresión de las citocinas MCP-1 y TNF en células RAW264.7 sin estímulo infeccioso y la de IL-6, TNF, IL-12p70 e IL-10 cuando son infectadas con *Salmonella*, lo que indica una respuesta inflamatoria. Sin embargo, *in vivo* no presenta efecto antibacteriano y los perfiles de expresión de citocinas en plasma refieren a una respuesta antiinflamatoria por un incremento de IL-10 y disminución de MCP-1 e IFN- γ . Por otro lado, Pin2[G] también inhibe el crecimiento de *S. Typhimurium* y estimula la actividad fagocítica y bactericida de macrófagos RAW264.7 a concentraciones bajas. También decrece la expresión de MCP-1 y TNF en macrófagos no infectados, pero incrementa la de IL-12p70 cuando se les infecta con *Salmonella*. En el modelo murino de infección gástrica se observó que Pin2[G] no detiene la infección y promueve un ambiente inflamatorio por el incremento de IL-6, IL-12p70 y la disminución de IFN- γ .

Se observó también que la mezcla de Pin2[G] y FA1 tiene efecto aditivo sobre el efecto antimicrobiano de cada uno sin incrementar su toxicidad a células eucariotas, aunque su uso combinado para tratar a ratones con infección gástrica resulta contraproducente.

Con esto se puede observar que Pin2[G] y FA1 tienen características antimicrobianas e inmunomoduladoras a nivel *in vitro*, pero que no se replican *in vivo*, al menos no en el modelo empleado. Teniendo esto como antecedente, se pueden establecer modelos de uso combinado con antibióticos o modificaciones estructurales que mejoren su efecto antibacteriano en infecciones sistémicas o en otros tipos de infecciones. Es así como se resalta la importancia de la comprensión de las características antimicrobianas e inmunomoduladoras de los péptidos antimicrobianos.

2. Introducción

Respuesta inmunitaria innata

El cuerpo humano cuenta con barreras anatómicas que le permiten evadir la colonización microbiana. Dichas barreras incluyen: piel, cilios del aparato respiratorio, pH intestinal, enzimas en lágrimas y saliva, entre otras, **Figura 1**. Cada barrera anatómica cuenta con elementos celulares que le permiten moldear su microbiota, tales como: macrófagos, monocitos, células polimorfonucleares y dendríticas. También existen diversas moléculas de respuesta inmunitaria que actúan de manera inmediata para inhibir el crecimiento bacteriano o para participar en cascadas de señalización que promoverán una respuesta más robusta y la erradicación del patógeno, entre estas se encuentran: citocinas, quimiocinas y los péptidos de defensa de huésped (Turvey *et al.*, 2010; Giamarellos *et al.*, 2012; Hancock *et al.*, 2016; Panda *et al.*, 2015).

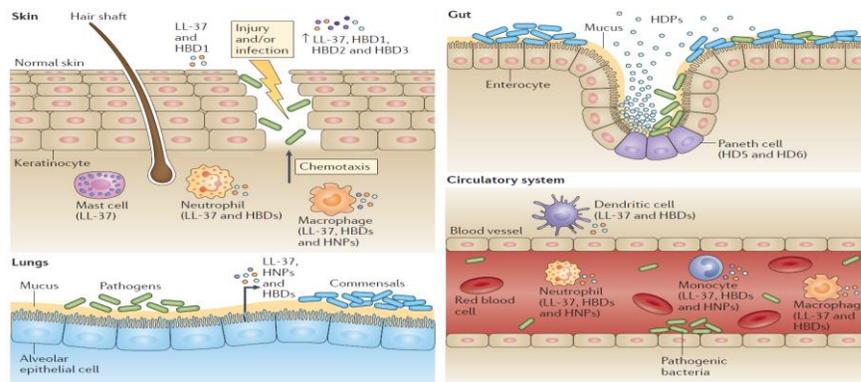


Figura 1. Barreras inmunitarias de piel, intestino, pulmones y sistema circulatorio (Hancock, 2014).

Ante un daño fisiológico o la invasión de un patógeno, el sistema inmune se encarga de montar mecanismos de defensa basados en la respuesta inmune innata (Takeda *et al.*, 2005). Esta sirve como antesala de la respuesta inmune adaptativa, en la que hay una mayor participación de receptores de antígenos o la activación de la presentación de antígenos, aumentando la expresión en superficie del complejo principal de histocompatibilidad (Kubelkova & Macela, 2019). Para que la respuesta inmune innata no sea contraproducente para el hospedero, debe de existir un efecto de reconocimiento de agentes extraños y una discriminación de lo propio. Es por lo que durante la respuesta inmune innata se activan vías de señalización particulares del organismo infectante. Al mismo tiempo, las células inmunitarias deben de generar un ambiente que favorezca la reparación del tejido dañado (El-Zayat *et al.*, 2019; Kubelkova and Macela, 2019).

Respuesta inflamatoria y el reconocimiento de patógenos

La activación de la respuesta inmune innata inicia procesos inflamatorios en los que se reclutan leucocitos, proteínas plasmáticas y líquidos humorales hacia la zona de daño tisular o de infección. Esto se refleja en el aumento del flujo sanguíneo, la expresión de moléculas de adhesión, como quimiocinas y citocinas, en neutrófilos y monocitos, además de que se estimula la permeabilidad de vasos sanguíneos y vénulas (Broz *et al.*, 2012; Abbas *et al.*, 2015).

La respuesta inflamatoria puede clasificarse en aguda y crónica. Un proceso inflamatorio agudo exitoso inicia con el reclutamiento de neutrófilos, la liberación de moléculas bactericidas e inflamatorias, seguido de la eliminación del patógeno y concluye con la fase de resolución y reparación. Si esta respuesta es incapaz de erradicar al agente infeccioso, se sustituye el reclutamiento de neutrófilos por el de macrófagos y se liberan moléculas quimioatrayentes de linfocitos T. Esto lleva a un proceso de inflamación crónica, en el cual se da la formación de granulomas y tejidos linfoides terciarios (Borish *et al.*, 2008; Medzhitov, 2008).

Los procesos inflamatorios se dan por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) o por patrones moleculares asociados a daño (DAMP, por sus siglas en inglés). Los PAMP son moléculas que generalmente pertenecen a bacterias, parásitos o virus. En el caso de las bacterias pueden ser lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas, carbohidratos, flagelina o ácidos nucleicos. El reconocimiento de estos patrones se debe a su alto grado de conservación evolutiva entre diversos organismos, lo cual permite que sean identificados por los receptores de reconocimiento de patrones o PRR, por sus siglas en inglés, presentes en distintas estirpes celulares (El-Zayat *et al.*, 2019; Rathinam *et al.*, 2019). Los PRR pueden encontrarse en el exterior de la membrana celular o en el citoplasma, como parte de membranas endosomales, lo cual permite que el sistema inmune identifique agentes infecciosos en espacios extra- e intracelulares (Rathinam *et al.*, 2019). Entre estos receptores se encuentran los receptores tipo Toll (TLR), los de lectina tipo-C (CLR), los tipo NOD (NLR), los tipo RIG-I (RLR) y los tipo AIM2 (ALR). Su activación inicia cascadas de señalización que llevan a la producción de moléculas inflamatorias y antiinflamatorias. Esta respuesta determinará el destino de las bacterias circundantes y el de las células infectadas (Borish *et al.*, 2003; Medzhitov, 2008; Rathinam *et al.*, 2019). Particularmente, la estimulación de los TLR desencadena cascadas de señalización enfocadas en la expresión de genes antimicrobianos dependientes de NF- κ B o reguladores de interferón (IRF) (Kubelkova and Macela, 2019).

Los TLR son proteínas transmembranales tipo I con dominios extracelulares que constan de repeticiones ricas en leucina y tienen forma de herradura. En su región intracelular cuentan con un dominio de receptor Toll/interleucina 1 (TIR) que activa la señalización intracelular (Gao *et al.*, 2017; El-Zayat *et al.*, 2019). Existen más de diez tipos de TLR en humanos y trece subtipos en murinos que reconocen una amplia gama de PAMP. Pueden estar anclados a la membrana celular y formar heterodímeros, como TLR2 con TLR1 o TLR6, u homodímeros, como TLR4, TLR5 y TLR10; pueden ser parte de la membrana de organelos como retículo endoplasmático, endosomas y lisosomas, como los TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 (El-Zayat *et al.*, 2019). Están presentes en macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK, mastocitos, basófilos y eosinófilos, aunque también se encuentran en células no inmunitarias, como las epiteliales, las endoteliales y los fibroblastos (Takeda *et al.*, 2005; El-Zayat *et al.*, 2019). La activación de los TLR desencadena cascadas de señalización que promueven la erradicación de patógenos y la reparación del tejido dañado por la liberación de citocinas, quimiocinas y moduladores inmunitarios. Sin embargo, su actividad debe de estar regulada, pues pueden dañar al hospedero incluso más que el patógeno (Gao *et al.*, 2017; El-Zayat *et al.*, 2019).

La estructura extracelular de los TLR les brinda especificidad hacia distintos PAMP, pero su actividad se ve beneficiada por moléculas adicionales que potencian su efecto. Por ejemplo, el TLR2 se acopla a TLR1 o TLR6 para reconocer mejor a los lipopéptidos de las bacterias Gram-positivas. Por su parte, el homodímero TLR4 detecta la presencia de LPS de bacterias Gram-negativas, pero para que esto ocurra el LPS debe de ser capturado por la proteína de unión a LPS (LBP) que lo une con el TLR4, el cual a su vez requiere de las proteínas accesorias MD-2 y CD14 para reconocer a los distintos quimiotipos de LPS. Otros componentes bacterianos como la flagelina son detectados por el TLR5; el RNA de doble cadena (dsRNA) es detectado a nivel intracelular por el TLR3; el DNA no metilado y los CpG-oligodesoxinucleótidos (CpG-DNA) activan a TLR9; mientras que el RNA de cadena sencilla (ssRNA) es detectado por TLR7. Los ligandos de TLR8 y TLR10 son materia de debate (Moresco *et al.*, 2011).

Las cascadas de señalización iniciadas por los TLR reclutan diferentes adaptadores en su dominio TIR, tales como: MyD88, asociado a TLR2, -4, -5, -7, -8 y -9; TIRAP, dependiente de MyD88 que participa en la respuesta por TLR2 y -4; TRIF, que es independiente de MyD88 y responde ante el estímulo de TLR3 y -4; TRAM, un mensajero dependiente de TRIF que regula la respuesta de TLR4; finalmente, SARM, que actúa como regulador negativo de TRIF y

participa en la señalización de TLR3 y -4 (El-Zayat *et al.*, 2019). Las respuestas dependientes de MyD88 inician una respuesta inflamatoria mediada por citocinas. Mientras que la respuesta dependiente de TRIF está asociada a la producción de interferón tipo-1. Otras moléculas producidas por la activación de los TLR son quimiocinas, péptidos antimicrobianos, elementos propios del complejo principal de histocompatibilidad y demás moléculas coestimuladoras de la respuesta inmune adaptativa (Moresco *et al.*, 2011; El-Zayat *et al.*, 2019).

La sobreestimulación de los TLR desencadena procesos de inflamación sistémica que inducen la activación de macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y linfocitos T. Esto lleva a la producción de citocinas inflamatorias. Las citocinas se unen a receptores presentes en la membrana de otras células y causan un estado inflamatorio al promover un incremento en la fagocitosis o en la permeabilidad del endotelio vascular. Además, se promueve la unión de neutrófilos a la superficie microvascular endotelial y su migración al exterior del sistema vascular, lo cual trae consigo la liberación de péptidos antimicrobianos, leucotrienos y especies reactivas de oxígeno. A nivel general, esto se ve reflejado en síntomas como fiebre, vasodilatación y la reducción de la fuerza contráctil del corazón (Moresco *et al.*, 2011). Muchas enfermedades están asociadas a una liberación excesiva de citocinas inflamatorias; ya que pueden causar debilidad, fatiga, letargia y anorexia, lo cual se traduce en daños al organismo que llevan al choque endotóxico o sepsis (Park *et al.*, 2009; El-Zayat *et al.*, 2019; Rathinam *et al.*, 2019). Es por esto que, si bien es importante el resolver la infección y prevenir que se desencadene un daño a nivel sistémico, también debe de considerarse la importancia de mantener el equilibrio de la respuesta inflamatoria (Angus *et al.*, 2013).

Péptidos antimicrobianos o de defensa de huésped

Los péptidos antimicrobianos (PAM) son proteínas pequeñas con actividad antibacteriana, antiviral y antifúngica (Lazzaro *et al.*, 2020). Están altamente conservados en el sistema inmunitario de distintas especies animales y vegetales, lo cual favorece la amplia variedad de características que pueden llegar a tener. En general, son de pequeño peso molecular ($\approx 15-150$ aminoácidos), anfipáticos, catiónicos (+2 a +9), ricos en argininas o lisinas y de variabilidad estructural, aunque, como ya se mencionó, cada péptido puede contar con características totalmente particulares según la función que tenga en el organismo del que provenga. También se dice que algunos tienen efecto sinérgico con antibióticos y efecto inmunomodulador. Además, su

gran diversidad, y capacidad de neutralizar endotoxinas o biopelículas bacterianas, los vuelven un blanco atractivo para el desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos (Marr *et al.*, 2006; Seo *et al.*, 2012; Boto *et al.*, 2018; Lazzaro *et al.*, 2020).

Se suele clasificar a los PAM según su longitud, estructura, carga o mecanismo de acción. Es así que se puede hablar de péptidos: 1) aniónicos, péptidos con cargas de -1 a -8 y compuestos por 5–70 aminoácidos, suelen ser α -helicoidales o cíclicos y actúan en conjunto con iones metálicos para formar puentes salinos con las membranas bacterianas; 2) catiónicos α -helicoidales, que se componen de menos de cuarenta aminoácidos y tienen carga de +2 a +9, suelen estar amidados en su extremo C-terminal, su estructura cuenta con 50% de aminoácidos hidrofóbicos, lo cual les permite interactuar con los blancos celulares; 3) péptidos catiónicos β -plegados, contienen de 2 a 8 residuos de cisteína que forman de 1 a 4 puentes disulfuro esenciales para la estabilidad y actividad de la mayoría de los péptidos pertenecientes a este grupo; 4) de cadena extendida, ricos en arginina, prolina, triptófano, glicina e histidina, pero carentes de estructura secundaria; 5) fragmentos de proteínas antimicrobianas, los cuales resultan de la lisis de proteínas con efecto antimicrobiano intrínseco (Zhang *et al.*, 2021).

La afinidad de los péptidos por las membranas bacterianas se debe principalmente a que estas contienen fosfolípidos hidroxilados aniónicos, como fosfatidilserina, cardiolipina y fosfatidilglicerol, además de lipopolisacárido en bacterias Gram-negativas, o ácidos teicoicos en las Gram-positivas (Yeaman *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2021). En general, los PAM aprovechan sus residuos hidrofílicos e hidrofóbicos para dispersarse en medios solubles, sean acuosos o ricos en lípidos, hasta que su cationicidad les atrae hacia membranas bacterianas aniónicas y se integran en ellas, disrumpiendo así su integridad. Durante este proceso se forman estructuras tipo barril, poro toroidal, carpeta o agregados que causan la lisis celular (Hayouja *et al.*, 2017).

El entendimiento de la función de los PAM dentro de los organismos ha avanzado con el tiempo. En un inicio, se les reconoció como agentes que inhibían el crecimiento bacteriano a concentraciones más bajas que los antibióticos convencionales, además de que atacaban diversos blancos bacterianos y no generaban resistencia bacteriana. Eventualmente, se determinó que los PAM sí presentan cierta especificidad por un blanco y que no están exentos de generar organismos resistentes (Lazzaro *et al.*, 2020). De igual forma, es sabido que actúan en la regulación de bacterias comensales y comunidades bacterianas en distintos tejidos de una amplia variedad de plantas, insectos, peces, mamíferos y demás organismos vivos (Lazzaro *et al.*, 2020).

Recientemente, se ha hecho énfasis en la capacidad de los PAM para influir, de forma directa o indirecta, en la respuesta inmunitaria al favorecer la recuperación de la integridad estructural de tejidos, la angiogénesis, la cicatrización de heridas, la diferenciación o activación de ciertas estirpes celulares o la modulación de la respuesta inflamatoria. Es por esto que se les empezó a denominar como: Péptidos de defensa de huésped o PDH (Hancock *et al.*, 2012; Hilchie *et al.*, 2013; Mookherjee, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

Efecto de los péptidos de defensa sobre la respuesta inmune

El efecto inmunomodulador de los PDH se ha estudiado en diversos modelos y se ha observado que, sin importar su origen natural o sintético, suelen tener efecto directo sobre la inflamación. Principalmente se ha estudiado su influencia en la expresión de citocinas en modelos *in vitro*, además de que se ha monitoreado su influencia en la expresión de genes involucrados en la inflamación mediante PCR en tiempo real y su relación con ligandos de TLR, tales como LPS, CpG oligonucleótidos y dsRNA (Lee *et al.*, 2019).

El efecto de los PDH sobre los perfiles de expresión de citocinas suele darse por una disminución de la expresión de citocinas inflamatorias, como: IFN- γ , TNF, IL-6, IL-1 β , y la estimulación de la síntesis de citocinas antiinflamatorias, como: IL-10 e IL-4 (Scott *et al.*, 2007; Capparelli *et al.*, 2012; Yunchao *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2019). De igual forma, se ha observado su interacción con receptores de quimiocinas (CCR6, CCR2), receptores tipo Toll (TLR3, TLR2, TLR1) y su participación en la fosforilación de segundos mensajeros (IRAK-1), activación de moléculas antiinflamatorias (IL-10, IL-1RA, A20, NF- κ BIA) o la de elementos inflamatorios (MCP-1, IL-8, TNF, NOS). También se ha reconocido su capacidad para interactuar con vías de señalización intracelular, como la del factor nuclear- κ B (NF- κ B), la cinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2), p38, la cinasa N-terminal JUN (JNK), la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) o la fosfoinositol 3-cinasa (PI3K); además de que pueden regular efectos apoptóticos (Davidson *et al.*, 2004; Funderburg *et al.*, 2007; Redfern *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2019; Mookherjee *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

Si bien no se entiende completamente cómo se lleva a cabo el efecto inmunomodulador de los PDH, sí se sabe que tiene que ver con las características fisicoquímicas que les confieren su secuencia de aminoácidos (Wang *et al.*, 2013). Se ha observado que péptidos carentes de aminoácidos aromáticos no interactúan con carbohidratos membranales y por ende no resultan

citotóxicos, mientras que los aminoácidos catiónicos favorecen su interacción con ciertos receptores proteínicos (Zhang *et al.*, 2016). Tampoco se tiene bien claro cómo ocurre la activación de los TLR por parte de PDH (Lee *et al.*, 2019). Sin embargo, se ha demostrado que algunos PDH, como la catelicidina LL37, la HBD3 o incluso las histonas, forman complejos inmunes con dsDNA que incrementan la actividad del TLR9. Esta asociación se ha explicado como resultado de las interacciones electrostáticas entre el complejo PDH-dsDNA con las cargas catiónicas de la región extramembranal del TLR9. Otro tipo de relación proteína-DNA, se da con la proteína *curli*, producida por ciertas enterobacterias, la cual forma complejos con DNA. Este complejo es endocitado por células inmunitarias por la interacción del *curli* con el TLR2; el DNA interactúa con TLR9 e incrementa así la activación inmunitaria (Lee *et al.*, 2019). Un efecto similar ocurre con la activación del TLR3 por parte de complejos PDH-dsRNA (Lee *et al.*, 2017). Contrario a esto, péptidos derivados de la cecropina pueden unirse al LPS bacteriano y así impedir su reconocimiento por parte de la LBP, lo que impide que se active el TLR4 y por ende se inhibe la producción de TNF (Scott *et al.*, 2000). Por otro lado, el péptido LL-37, forma activa de la catelicidina, puede tener diversos blancos membranales o intracelulares, como proteínas de señalización o factores de transcripción (Nijnik *et al.*, 2009). También se han registrado péptidos carentes de acción antimicrobiana, pero que por su efecto inmunomodulador favorecen a la erradicación de infecciones bacterianas (Scott *et al.*, 2007; Mansour *et al.*, 2014). No todos los péptidos presentan actividad antimicrobiana a la par de acción inmunomoduladora; por ejemplo, el péptido Pa-MAP, derivado de la sangre del pez de espalda negra, *Pleuronectes americanus*, inhibe la infección murina con *E. coli*, pero no tiene efecto alguno en los perfiles de secreción de citocinas o moléculas inflamatorias (Teixeira *et al.*, 2013).

Con esto se puede observar cómo los péptidos de defensa del huésped no son solo moléculas antimicrobianas que se limitan a actuar en la respuesta inmune innata. Sino que sus propiedades les vuelven moléculas que influyen directamente sobre el patógeno y que favorecen la activación de la respuesta inmune mediante mecanismos todavía no entendidos.

Infección y respuesta inmune por *Salmonella* Typhimurium

Las enterobacterias del género *Salmonella*: *Salmonella enterica* serovar Typhi y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, son microorganismos ampliamente distribuidos en la comunidad que causan infección intestinal en el humano y que son considerados por la OMS como de urgencia para el desarrollo de nuevos antimicrobianos (WHO, 2014). *S. Typhimurium* y otras especies de *Salmonella* no tifoidea (NTS) causan 95.1 millones de infecciones a nivel mundial (Stanaway *et al.*, 2019). Las características clínicas de la infección por *Salmonella* dependen de su serovar, la especie hospedadora y el estado inmunológico de esta. Los serovares de NTS pueden infectar a una amplia variedad de mamíferos, aves y reptiles, mientras que los serovares Typhi y Paratyphi tienen un rango de huéspedes más restringido. Uno de los modelos más estudiados es *S. Typhimurium*; ya que, en murinos causa síntomas similares a la fiebre tifoidea que produce *S. Typhi* en humanos (Broz *et al.*, 2012; Pham *et al.*, 2015).

La infección por *S. Typhimurium* inicia tras su consumo en alimentos o agua contaminada. Tras su ingesta alcanza el lumen del íleo intestinal y se adhiere a las células M, población celular que facilita la llegada de antígenos a las placas de Peyer. Si bien *S. Typhimurium* infecta al organismo a través de las células M o de las placas de Peyer, también es capaz de adentrarse en otros tipos de epitelios gracias a los factores de virulencia presentes en su Isla de patogenicidad-1 (SPI-1). En la SPI-1 se encuentran los genes encargados de la síntesis del sistema de secreción tipo III, el cual modifica el citoesqueleto y la membrana de las células del hospedero. Con esto interrumpe la continuidad de las uniones celulares, invade las células M, las placas de Peyer e infecta la región basal del epitelio intestinal, donde es fagocitada por los macrófagos. Dentro de las vacuolas de estos, activa la isla de patogenicidad-2 (SPI-2) que expresa un sistema de secreción tipo III que impide la acción del fagolisosoma y le permite sobrevivir y replicarse dentro de las células (Broz *et al.*, 2012; Pham *et al.*, 2015). Su supervivencia dentro de dichas células le permite dispersarse por el sistema linfático y torrente sanguíneo para infectar hígado y bazo (Wagner *et al.*, 2011).

S. Typhimurium provoca la inflamación de la mucosa intestinal y el reclutamiento de neutrófilos y monocitos inflamatorios. Ambos eventos son parte de la activación de la respuesta inmune innata y están asociados al reconocimiento de PAMPs por TLRs o NLR presentes en el epitelio intestinal, en macrófagos y en células polimorfonucleares. Esto conlleva a la liberación de citocinas proinflamatorias como IFN- γ , IL-8, IL-10, pro-IL- β , IL-18 o IL-23, entre otras

(Medzhitov *et al.*, 2001 Borish *et al.*, 2003; Pham *et al.*, 2015). Resulta de particular importancia la expresión de IFN- γ por neutrófilos y células NK, particularmente las Thy-1, pues se ha demostrado su importancia en la mediación de la infección por *S. Typhimurium* (Pham *et al.*, 2015). Durante la infección primaria también es importante la participación de células T CD4, T CD8 y dendríticas residentes de intestino, estas últimas dado que reconocen el LPS y la flagelina de *Salmonella* y con esto promueven la expresión de CCR7, CD80, CD86 y CD40. Las células dendríticas maduras participan en la presentación de antígenos y activan la respuesta mediada por células T CD4. Sin embargo, la baja frecuencia de epítomos de *Salmonella* presentados por los complejos de histocompatibilidad I y II dificulta el estudio del repertorio de células-T en nódulos linfáticos no mesentéricos. Por su parte, las células B participan en la presentación de antígeno y la liberación de citocinas inflamatorias (Pham *et al.*, 2015). Es así como la expresión de las citocinas inflamatorias IFN- γ , IL-17 e IL-22 reflejan la importancia de una respuesta celular tipo Th1, para la erradicación bacteriana, en conjunto con una Th17, para otorgar protección al epitelio intestinal (Pham *et al.*, 2015; Peres *et al.*, 2021).

Por su parte, las células epiteliales del colon, junto con los leucocitos ahí presentes, secretan PDH para contrarrestar las infecciones por enteropatógenos y favorecer la estabilidad de la microbiota intestinal (Blyth *et al.*, 2020). Pese a esto, no se ha logrado aclarar el papel de estos péptidos durante la infección por *Salmonella Typhimurium*; ya que, por ejemplo, la catelicidina LL-37, secretada por neutrófilos y enterocitos, que tiene efecto antimicrobiano tanto *in vitro* como *in vivo* contra *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*, es incapaz de detener la infección contra *S. Typhimurium*. Se ha observado que esto se debe a que *Salmonella* es capaz de modificar la superficie de su membrana mediante la acilación del lípido A, con lo que se pierde la atracción electrostática entre el péptido y la bacteria (Guo *et al.*, 1998, Blyth *et al.*, 2020). Sin embargo, LL-37 logra regular la infección por *Salmonella* mediante la activación y estimulación de TLR4, lo cual conlleva a la liberación de citocinas inflamatorias, como CXCL8 e IL-1 β . Además, previene la ruptura de las uniones celulares, con lo que decrece la colonización extraintestinal bacteriana y previene la pérdida de agua y nutrientes (Jung *et al.*, 2015; Marin *et al.*, 2019).

Otro tipo de PDH producido por los enterocitos son las β -defensinas humanas 1-4 (HBD1-4). De estas, HBD-1 es expresada constitutivamente, mientras que HBD-2, -3 y -4 son expresadas principalmente en procesos infecciosos. Se ha observado que HBD-3 tiene actividad bacteriostática contra *S. Typhimurium*. Otras de sus funciones poco estudiadas durante la

infección por *Salmonella* es actuar como quimioatrayente y estimular la maduración y activación de leucocitos, de TLR1/2 y promover la expresión de citocinas inflamatorias (Blyth *et al.*, 2020).

Por otro lado, se han desarrollado péptidos sintéticos enfocados en inhibir el crecimiento de *S. Typhimurium* o en estimular la respuesta inmune para detener su infección. Tal es el caso del péptido JH-3, que inhibe su crecimiento *in vitro* y protege a ratones con infección intestinal por *Salmonella*. Además de que reduce la apoptosis de células RAW264.7 y promueve que expresen IL-2, IL-6 y TNF (Wang *et al.*, 2019). En la misma línea, los péptidos Bc5 y BSN-37, miembros de la familia de las catelicidinas, inhiben el crecimiento de *S. Typhimurium* LT2 y *S. Typhimurium* ATCC14028 (Yang *et al.*, 2020). Mientras que un derivado de LL-37, denominado KR-12-a5, inhibe el crecimiento de *S. Typhimurium* KCTC1926 y la secreción de NO, TNF, IL-6 y MCP-1 por células RAW estimuladas con LPS (Kim *et al.*, 2017). Finalmente, el péptido α -helicoidal NK2A, derivado de la lisina bovina NK, inhibe el crecimiento de cepas MDR de *Salmonella* al unirse a su LPS (Dassanayake *et al.*, 2021).

Si bien se puede observar cómo el uso de péptidos antimicrobianos para tratar infecciones por *Salmonella* ha tenido un auge en los últimos años, mucho queda por hacer en cuanto a la comprensión de su efecto sobre la respuesta inmune a nivel *in vivo*.

3. Antecedentes

Antimicrobianos provenientes de veneno de alacrán

Los alacranes son arácnidos presentes en todos los continentes, con excepción de la Antártida. El estudio de su veneno como fuente de fármacos antimicrobianos o anticancerígenos está bien documentado en la medicina tradicional China desde hace al menos 2 000 años (Shao *et al.*, 2007; Yacoub *et al.*, 2020). Es así que desde el descubrimiento del primer PAM, proveniente del alacrán *Leiurus quinquestriatus*, se ha reconocido al veneno de estos como una fuente rica de antimicrobianos formadores de poros. Estos péptidos ricos en residuos catiónicos y anfipáticos pueden presentarse en tres tipos de estructuras: 1) péptidos con puentes disulfuro, ubicuos entre los venenos de alacranes y que poseen de 3 a 4 puentes disulfuro; 2) péptidos anfipáticos de cadena alfa y 3) péptidos ricos en prolina o glicina (Harrison *et al.*, 2014; Tawfik *et al.*, 2021).

Se ha observado que la región N-terminal es de suma importancia para que los PAM derivados de veneno de alacrán cumplan con su efecto antibacteriano (Hernández *et al.*, 2011; Harrison *et al.*, 2014). El estudio de su estructura y la relación entre aminoácidos polares y no-

polares, ha llevado a la propuesta de que la región polar de los PAM interactúa con las cargas negativas y el núcleo hidrofóbico de la membrana bacteriana para que los péptidos se inserten en ella. Tras esto, forman parches polares que interactúan con las cabezas de fosfolípidos de la membrana interna, causan una curvatura negativa en ella que la desestabiliza y provocan la muerte celular (Bobone *et al.*, 2012; Harrison *et al.*, 2014).

El estudio de los PAM derivados de alacrán se ha enfocado en los que carecen de puentes disulfuro. Estos se clasifican en PAM de cadena larga (>35 a. a.), de cadena intermedia (20-35 a. a.) y de cadena corta (<20 a. a.). Entre los primeros se pueden mencionar ejemplos como la opistoporina 1 y 2 (4.8 kDa y 44 a. a., ambos), que son α -hélices provenientes del alacrán *Opisthoptalmus carinatus*. También está la hadrurina (4.4 kDa, 41 a. a.), presente en el veneno de *Hadrurus aztecus*, esta es una α -hélice activa contra *E. coli* y *P. aeruginosa* con ligera actividad hemolítica (Torres-Larios *et al.*, 2000). En la misma línea está la vejovina (4.8 kDa, 47 a. a.), aislada de *Vaejovis mexicanus*, es una α -hélice con 52% de homología con la hadrurina que actúa contra microorganismos Gram-negativos, pero no Gram-positivos, además de que es hemolítica a altas concentraciones y poco estable en el veneno, pues tiende a perder los primeros ocho aminoácidos de su N-terminal, generando un derivado (Vm36) que carece de actividad antimicrobiana (Hernández *et al.*, 2011). Finalmente, las Pandininas 1 y 2 son PAM aislados del veneno de *Pandinus imperator*. Por un lado, la Pandinina 1 (Pin1) es una doble α -hélice dividida por un pliegue causado por la Pro-19; mientras que, la Pandinina 2 (Pin2) es una α -hélice de los residuos 2 a 18. Esta diferencia no afecta su actividad contra bacterias Gram-positivas, ni Gram-negativas, pero sí modifica su actividad hemolítica, siendo Pin2 cincuenta veces más hemolítico que Pin1 (Corzo *et al.*, 2001; Nomura *et al.*, 2005). Mediante estudios de resonancia magnética nuclear se determinó que Pin2 se inserta en la membrana celular y causa la pérdida de constituyentes intracelulares mediante la formación de poros (Nomura *et al.*, 2005).

Antimicrobianos desarrollados en el laboratorio

En nuestro laboratorio se han desarrollado diversos péptidos derivados de venenos de animales que poseen actividad antimicrobiana, principalmente contra algunas bacterias multidrogo resistentes, MDR, causantes de infecciones sistémicas o dérmicas. Uno de esos péptidos es Pin2[G], **Figura 2**, un derivado de la Pandinina 2 del alacrán *Pandinus imperator* cuya estructura se modificó al sustituir su residuo de Prolina-14 por una glicina, dicha prolina

formaba un bucle intermitente que dividía a la alfa hélice, la sustitución de este residuo por glicina da firmeza a la hélice y disminuye su efecto hemolítico, además de que conserva su efecto antimicrobiano (Corzo *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2014). Aún con esto, Pin2[G] es hemolítico a 3 µg/mL. En cuanto a su efecto antimicrobiano, se determinó mediante ensayos de concentración mínima inhibitoria (MIC) que puede inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC21293 (MIC= 7.5 µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (MIC= 60 µg/mL), *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MIC= 48.1 µg/mL) y de las bacterias MDR aisladas de paciente con pie diabético, *S. aureus* UDP13 (MIC= 10 µg/mL) y *P. aeruginosa* UDP3 (MIC= 30 µg/mL) (Arenas *et al.*, 2016; Ibarra, 2017). De igual forma, en un modelo de infección subcutánea por *S. aureus* UDP13 y *P. aeruginosa* UDP3 en conejos se observó que Pin2[G] inhibió el crecimiento de ambas bacterias y favoreció el proceso de cicatrización.

Otro péptido derivado de veneno de alacranes es FA1, **Figura 2**, el cual es una quimera de la región amino de la vejovina de *Vaejovis mexicanus* con la región carboxilo de la hadrurina de *Hadrurus gertschi* a la que se le agregó una región rica en lisinas para incrementar su cationicidad y con esto su efecto antibacteriano (Sánchez *et al.*, 2013). Es así como el efecto antibacteriano de FA1 es bastante notorio contra bacterias Gram-negativas, pues inhibe el crecimiento de las cepas de referencia: *Escherichia coli* ATCC25922 (MIC= 6.25 µg/mL), *P. aeruginosa* ATCC27853 (MIC= 15 µg/mL) y de la bacteria MDR: *P. aeruginosa* UDP3 (MIC= 30 µg/mL). No es tóxico contra ciertas estirpes eucariotas, tales como células renales embrionarias HEK 293 o fibroblastos COS-7, además de que tiene un bajo índice hemolítico (>440 µg/mL). A diferencia de Pin2[G], FA1 no contrarresta la infección de herida por *S. aureus* UDP13 ni por *P. aeruginosa* UDP3 (Ibarra, 2017; Sánchez *et al.*, 2013; Arenas *et al.*, 2020).

Péptido	Peso	Secuencia	Carga	Estructura
Pin2[G]	2, 572 Da	FWGALAKGALKLIGSLFSSFSKKD	+3	α-hélice
FA1	3, 008 Da	GILKTIKSIASKVANTVQKLRKAKNAV	+8	α-hélice

Figura 2. Características de los péptidos Pin2[G] y FA1. Se muestran diferentes propiedades de los péptidos usados en este estudio, en rojo se resaltan los residuos que les diferencian de sus péptidos predecesores.

Mediante una colaboración con la Unidad de Investigación Preclínica de la Facultad de Química de la UNAM se establecieron modelos de infección sistémica con *S. Typhimurium* en ratones BALB/cAnNHsd, inoculados vía intragástrica y tratados vía intravenosa con Pin2[G] y

FA1 (0.56 mg/kg, ambos) cada 24 horas por siete días. En los ratones que recibieron Pin2[G] se redujo la infección, aunque sin resolverla. Mientras que, los tratados con FA1 no redujeron la carga bacteriana, pero tampoco mostraron efectos adversos al tratamiento. Por otro lado, el Dr. Bruno Rivas, de la unidad de investigación médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, determinó por citometría de flujo que Pin2[G] estimula la expresión de los receptores TLR4, TLR2 y NOD2 en células de pulmón con adenocarcinoma humano (A549) y FA1 la producción de TLR2 y NOD2.

En colaboración con el Dr. Robert Hancock, se determinó la influencia de los péptidos Pin2[G] y FA1 sobre la secreción de las citocinas inflamatorias IL-6, TNF y la quimiocina MCP-1 (CCL2) en células RAW264.7, así como la IL-6 y la quimiocina IL-8 en células epiteliales bronquiales humanas, HBE. Se observó que Pin2[G] no modificó el perfil de IL-6 y TNF en las células RAW264.7, pero sí el de MCP-1. Por otro lado, en células HBE se disminuye la secreción de IL-6 e IL-8 cuando se les trata con Pin2[G] o FA1. Como se puede observar, el comportamiento de los péptidos es particular al modelo en el que se les estudie ya sea bacteriano, eucariota o animal. Esto puede deberse a condiciones fisiológicas difíciles de replicar, o bien, a las características de cada tipo celular. Lo cual pone de manifiesto el efecto que un mismo tratamiento puede tener sobre los elementos involucrados en el proceso infeccioso.

Es con estas observaciones que se plantea la posibilidad de que los péptidos Pin2[G] y FA1 tengan, además del efecto antimicrobiano, influencia sobre la actividad de ciertas estirpes de líneas celulares inmunitarias. Lo cual les colocaría como péptidos de defensa e incrementaría el interés en comprender su influencia sobre la respuesta inflamatoria cuando son usados para resolver una infección bacteriana a nivel sistémico por *Salmonella Typhimurium*.

4. **Justificación**

Se ha reportado el papel de los PDH como inmunomoduladores y su importancia en la resolución de diferentes tipos de infecciones. Previamente, se ha demostrado que los péptidos Pin2[G] y FA1 tienen cierta capacidad antimicrobiana e inmunomoduladora. Por lo que profundizar en el conocimiento del efecto que los péptidos tienen sobre la respuesta inmunológica en modelos animales de infección sistémica puede llevar al desarrollo de nuevas alternativas que consideren el papel del hospedero durante la resolución de infecciones.

5. **Hipótesis**

Los péptidos Pin2[G] y FA1 actuarán como inmunomoduladores durante la resolución de infección sistémica con *S. Typhimurium*.

6. **Objetivo**

Evaluar y caracterizar la capacidad inmunomoduladora de los péptidos Pin2[G] y FA1 para el tratamiento de infecciones sistémicas, considerando el modelo de infección por *S. Typhimurium* en ratones BALB/c.

7. **Objetivos particulares**

1. *In vitro*, analizar el efecto de los péptidos Pin2[G] y FA1 sobre la integridad y activación de estirpes celulares involucradas en la infección por *S. Typhimurium*.
2. *In vitro*, estudiar el efecto del tratamiento con Pin2[G] y FA1 sobre el perfil de expresión de citocinas pro- y antiinflamatorias en células retadas con *S. Typhimurium*.
3. Estudiar el perfil de citocinas presentes en el suero de ratones infectados con *S. Typhimurium* tratados con Pin2[G] y FA1.

8. Estrategia experimental

Condiciones de crecimiento de la cepa bacteriana y línea celular

Se usó la cepa de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 almacenada a -76°C en 30% de glicerol. Para trabajar con ella se le estirió en agar Xilosa-Lisina desoxicolato (XLD) y se incubó toda la noche a 37 °C. Se obtuvieron colonias aisladas y una de estas se inoculó en un tubo con 3mL de caldo LB, el cual se puso en agitación a 37 °C durante 18 horas. A partir de estos cultivos se hicieron las infecciones en los modelos *in vitro* e *in vivo*.

De igual forma, se usó la línea celular de macrófagos RAW 264.7(ATCC® TIB-71™), donada por la Doctora Mayra Silva Miranda del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Esta se almacenó a -70 °C en viales con 90% de suero fetal bovino inactivado (SFBi), 5% de caldo RPMI-1640 y 5% de Dimetilsulfóxido (DMSO). También se usaron macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) de ratón C57BL/6, donados por el estudiante de doctorado Edgardo Madrid Paulino del grupo del Dr. Gustavo Pedraza. Ambas se crecieron en caldo RPMI + 10% de SFBi a 37°C y 5% de CO₂.

Modelos animales

Para los modelos de infección gástrica se usaron ratones macho BALB/c de 4-6 semanas de edad y 19-22 g de peso. Se mantuvieron en cajas separadas por grupo de trabajo en condiciones de luz/oscuridad 12:12 h con alimento y agua *ad libitum*. Para su uso se siguieron las recomendaciones de la *Guide for the care and use of laboratory animals* para asegurar el correcto uso de los animales, así como los requerimientos establecidos en el bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM con base en la NOM-062-ZOO-1999. Este proyecto tuvo la autorización del comité de ética del IBt-UNAM bajo el número de proyecto 317.

Ensayos de viabilidad celular

Dado que los péptidos de defensa son moléculas catiónicas e hidrofóbicas, suelen tener cierto efecto citotóxico contra bacterias y células eucariotas. Por lo que es importante determinar las concentraciones a las que los péptidos no afectan la integridad celular y por ende nos permiten realizar los demás estudios. Para esto, se sembraron 1x10⁵ células/pozo de macrófagos murinos RAW 264.7 y BMDM en una placa de 96 pozos con caldo RPMI complementado con 10% de SFBi y se incubaron por 24 h a 37°C con 5% de CO₂. Las concentraciones que se usaron para retar a las células se definieron a partir de experimentos anteriores en los que se observó que se

requieren de 20µg/mL Pin2[G] y de 400 µg/mL de FA1 para causar toxicidad contra células eucariotas. Es así como, se agregó Pin2[G] en concentraciones de: 0.08, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5 y 10 µg/mL o bien FA1 en concentraciones de: 1.17, 2.34, 4.69, 9.38, 18.75, 37.5, 75 y 150 µg/mL. También se contó con un grupo sin estímulo y un grupo lisado con Tritón X-100, que funcionaron como control positivo y negativo, respectivamente. El reto se hizo en un volumen final de 100 µL de RPMI+ 10% SFBi durante 24 horas a 37°C en 5% de CO₂. Después de esto, se retiró el sobrenadante y se lavó a las células con PBS para luego añadir 100 µL de medio nuevo con 20 µL del reactivo *CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent*, el cual contiene un reactivo de tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, *MTS*] y un acoplador de electrones [Etosultafo de fenacina, *PES*]. Dicho ensayo consiste en la reducción del MTS por células vivas en un producto de formazan soluble en medio de cultivo, cuya absorbancia puede medirse a 490 nm. La producción de formazan es directamente proporcional a la cantidad de células vivas. Las células se incubaron por una hora a las condiciones mencionadas y se registró la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Ensayo de concentración mínima inhibitoria

Para determinar la concentración a la cual los péptidos inhiben el crecimiento de *Salmonella* Typhimurium, se realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria mediante el ensayo de dilución seriada en una placa de 96-pozos. Para esto, se sembró por estriado a *S. Typhimurium* en una placa con agar XLD y se incubó toda la noche a 37°C. Tras esto, se seleccionó una colonia aislada y se inoculó en un tubo con 3 mL de caldo Luria Bertani (LB) hasta que alcanzó una D.O._{600nm} de 0.08-0.13, la cual representa una población celular de aproximadamente 10⁷UFC/mL. De este medio se hizo una dilución 1:100 en caldo Mueller-Hinton (MH) y se inocularon 50 µL en una placa de 96-pozos, la cual ya contenía 50 µL de caldo MH con péptido FA1 o Pin2[G] en dilución seriada de 1.17-150 µg/mL. Esta mezcla se incubó durante 18 h a 37°C. Tras este tiempo, se midió la absorbancia de los pozos a 630 nm y con esto se determinó qué concentraciones impiden el crecimiento bacteriano, siendo la mínima de estas la que es considerada la mínima inhibitoria. Como controles se usaron péptido en medio MH, medio MH sin péptido ni bacteria, medio MH con bacteria y medio MH con bacteria y 10 µg/mL del antibiótico ceftriaxona, el cual es usado en la práctica para el tratamiento de infecciones por *Salmonella* Typhimurium. Cada experimento se hizo por triplicado en tres ocasiones distintas.

Determinación de efecto bactericida

Para averiguar si los péptidos tienen efecto bactericida o bacteriostático sobre *S. Typhimurium* se tomaron 10 µL de los pozos de los ensayos de MIC, en los que no creció bacteria, se sembraron en placas de agar XLD y se incubaron por 18 h a 37° C. Si en la placa de agar crecen bacterias en los inóculos procedentes de los pozos que tienen cuatro veces lo equivalente a la mínima inhibitoria, entonces se considera que el péptido tiene efecto bacteriostático, de no ser así se asume como bactericida.

Estimulación de fagocitosis

Tomando como referente el efecto que tienen FA1 y Pin2[G] sobre la estimulación de expresión de receptores TLR2, TLR4 y NOD2 que se menciona en los antecedentes, resulta posible que ciertas actividades inmunológicas se activen en presencia de los péptidos. Una de las más importantes es la capacidad de fagocitar bacterias. Es así como se determinó si los macrófagos RAW264.7 y BMDM estimulados con diferentes concentraciones de Pin[G] y FA1 incrementan su capacidad de fagocitar *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028.

Para esto, se sembraron 1×10^5 células/pozo en placas de 96 pozos con medio RPMI + 10% de SFBi y se incubaron toda la noche a 37°C con 5% CO₂. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se añadieron diferentes concentraciones de péptido FA1 (1.17-150 µg/mL) y Pin2[G] (0.08-10 µg/mL) y se incubaron por 20 h a las condiciones mencionadas. Se consideraron los resultados de viabilidad celular para asegurarnos de que todas las placas tuvieran el mismo número de células tras la incubación con el péptido. Tras esto, se retiró el sobrenadante y se congeló a -20°C para su posterior análisis por citometría de flujo. Luego, se realizó la infección al añadir 100 µL de RPMI+10% SFBi con 1×10^6 células de *S. Typhimurium* ATCC 14028, las células infectadas se incubaron durante 30 min. Después, para erradicar a las bacterias no fagocitadas, se retiró el medio, se agregó nuevo caldo suplementado con gentamicina (100 µg/mL) y se incubó durante 1 hora. Posteriormente, se retiró el medio y lavó a las células dos veces con PBS. Tras esto, se siguió el protocolo de Noster (2019) para recuperar bacterias intracelulares. Para esto se agregaron 100 µL de 0.05% Tritón X-100 para lisar a los macrófagos, esta suspensión se centrifugó a 6,000 x g por ocho minutos. El sobrenadante se decantó y el pellet se diluyó en 1 mL de PBS estéril, de este se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en agar XLD para incubarlas a 37°C por 20 h. Al día siguiente se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) y se multiplicó por el factor de dilución correspondiente para

calcular el número de bacterias recuperadas de los macrófagos. Cada ensayo se hizo por triplicado. Como control se usaron: macrófagos sin péptido e infectados con *Salmonella*, como referencia de la fagocitosis basal sin estímulo, y macrófagos sin péptido y sin infección, para comprobar que el medio de cultivo no estuviera contaminado con *Salmonella* Typhimurium.

Para el ensayo de efecto bactericida por macrófagos se siguió el mismo protocolo, solo que el tiempo de incubación de macrófagos con gentamicina fue de 18 horas.

Modelo de infección gástrica

El modelo de infección *in vivo* se hizo con ratones macho BALB/c de 19-22 g. Para realizar la infección, se sedó a los ratones con cloroformo y por vía oral se introdujo una sonda para administrar 10^7 UFC de *Salmonella* Typhimurium ATCC14028 disueltas en 200 μ L de PBS. Los ratones infectados se separaron en grupos de trabajo (n=3) según el tratamiento que recibieron: PBS, Pin2[G] (2.5 mg/kg), FA1 (5 mg/kg) o ceftriaxona (70 mg/kg). Existió además un grupo de ratones que no fueron infectados a manera de control. Cada grupo se separó en jaulas distintas y se mantuvo en condiciones de luz/oscuridad 12:12h con comida y agua *ad libitum*.

Previo a la infección, y durante los tres días que duró el experimento, cada 24 h se registró el peso de los ratones, se colectaron heces y se administró el tratamiento correspondiente disuelto en 200 μ L de PBS. El seguimiento del peso de los ratones y el recuento bacteriano en heces nos permitió determinar la evolución de la infección. La administración se realizó vía intravenosa; ya que, previamente, en colaboración con el instituto de química de la UNAM, se determinó que otras vías de administración, como la intraperitoneal, y que concentraciones superiores a las aquí usadas pueden resultar tóxicas para los ratones.

Al finalizar el tratamiento se obtuvo sangre por punción cardiaca, se sacrificó a los ratones mediante dislocación cervical y se colectó el hígado. Mediante dilución seriada se determinó la cantidad de bacterias presentes en hígado y se obtuvo plasma de la sangre al centrifugarla a 1, 000 x g durante 5 minutos. El plasma se almacenó a -20 °C para determinar los perfiles de expresión de citocinas.

Cuantificación de bacterias en heces

Para evaluar la evolución de la infección y el efecto que tiene el tratamiento con péptidos sobre esta, se determinó el número de bacterias presentes en heces. Para ello, las heces se colectaron en tubos Eppendorf de 2 mL previamente pesados. Los tubos se pesaron nuevamente para calcular el peso de las heces. A continuación, se agregó 1 mL de PBS para diluir la materia fecal y se hicieron diluciones desde 1:10 hasta 1:100 000. De cada dilución se sembraron 10 µL en una placa con agar XLD, el cual es un medio diferencial que permite la identificación y aislamiento de *S. Typhimurium*. Las placas se incubaron durante 18 horas a 37°C. Finalmente, se contó el número de unidades formadoras de colonia por dilución y se determinó el número de UFC por gramo de heces de ratón (UFC/g) con la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC \times Factor\ de\ dilución \times 100}{peso\ de\ heces/1000}$$

Este mismo procedimiento se siguió para determinar la presencia de *S. Typhimurium* en hígado. Cada experimento se repitió por triplicado para que la prueba tuviera rigor estadístico.

Determinación de perfiles de citocinas

El potencial inmunomodulador de los péptidos antimicrobianos se determinó mediante el análisis por citometría de flujo de los perfiles de expresión de las citocinas: IL-6, IL-10, MCP-1-IFN, IL-12p70 y TNF en el caldo de cultivo de los macrófagos usados para el ensayo de estimulación de fagocitosis y en el plasma de los ratones infectados con *S. Typhimurium*. Para esto, se usó el *BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit*.

De inicio, se hizo una curva de calibración de las esferas con anticuerpos y el fluoróforo ficoeritina (PE) del kit. Con esta curva se calculan los picogramos por mililitro (pg/mL) de cada citocina en plasma a partir del valor de emisión de fluorescencia que se obtiene del ensayo de citometría, así como los valores máximos y mínimos de detección. La reacción se hizo a partir de una *Master mix* que contiene: 5 µL de cada anticuerpo por el número de reacciones a hacer, a esta mezcla se le añadió *Solución diluyente* para que el volumen por reacción sea de 50 µL. A este se le añadieron 50 µL de la muestra problema y 25 µL de PE. La reacción se incubó por dos horas en oscuridad. Posteriormente, se añadió 1 mL de *Wash Buffer* y se centrifugó por 5 min a 200 g. Finalmente, se añadieron 350 µL de *Wash Buffer* y se procedió a la lectura de la muestra en un citómetro Attune NxT. Se registraron 10,000 eventos a un flujo de 100 µL/min.

Los resultados se analizaron con el programa FlowJo v10.7.1. Se generó una gráfica que compara el tamaño (FWD) con la complejidad (SSC) de las esferas, de esta se delimitaron las regiones de interés que corresponden a la fluorescencia de PE unido al anticuerpo y se midió la intensidad de fluorescencia correspondiente a cada citocina. Estos valores se compararon con los de la curva estándar para calcular la concentración de cada citocina en picogramos por mililitro (pg/mL). Esta medición se hizo con dos muestras independientes.

Acción combinada de los péptidos

Para determinar si la mezcla de péptidos incrementa su efecto antibacteriano se partió de los resultados de la MIC contra *S. Typhimurium* ATCC 14028. Con lo que se mezclaron diferentes concentraciones de FA1 [0.58-37 µg/mL] con Pin2[G] [0.58-75 µg/mL] en un volumen final de 100 µL de caldo MH en placas de 96 pozos con 10⁷ UFC de *S. Typhimurium*. Esta mezcla se incubó durante 18 horas y se midió la absorbancia a 590 nm. Las concentraciones en las que no hubo crecimiento bacteriano se usaron en la fórmula:

$$FIC \frac{A}{CMI_A} + \frac{B}{CMI_B}$$

En donde:

A= Concentración de A;

B= Concentración de B;

CMIA= MIC de A

CMIB= MIC de B.

Según el valor de FIC se puede determinar si la combinación tiene un efecto sinérgico (FIC ≤ 0.5), aditivo (FIC = 1), indiferente (> 0.5- ≤ 4) o antagonista (>4).

Efecto de la mezcla de péptidos sobre la viabilidad de macrófagos

Para determinar el efecto que tiene la combinación de los péptidos sobre la viabilidad de las células RAW 264.7. Se incubó en una placa de 96-pozos a 10⁵ células/pozo en caldo RPMI+10% de SFBi toda la noche a 37°C con 5% de CO₂. Al día siguiente, se retiró el medio y se agregó nuevo caldo suplementado con mezclas de Pin2[G] [0.58-75 µg/mL] y FA1 [0.3-37 µg/mL] en un volumen de 100 µL. Es así que cada pozo contaba con ambos péptidos en diferentes concentraciones. Nuevamente se incubó a las células por 18 horas a las condiciones previamente mencionadas. Finalmente, se determinó la viabilidad celular con el reactivo

CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent siguiendo los pasos ya descritos. Este ensayo se realizó en tres ocasiones distintas.

Análisis estadístico

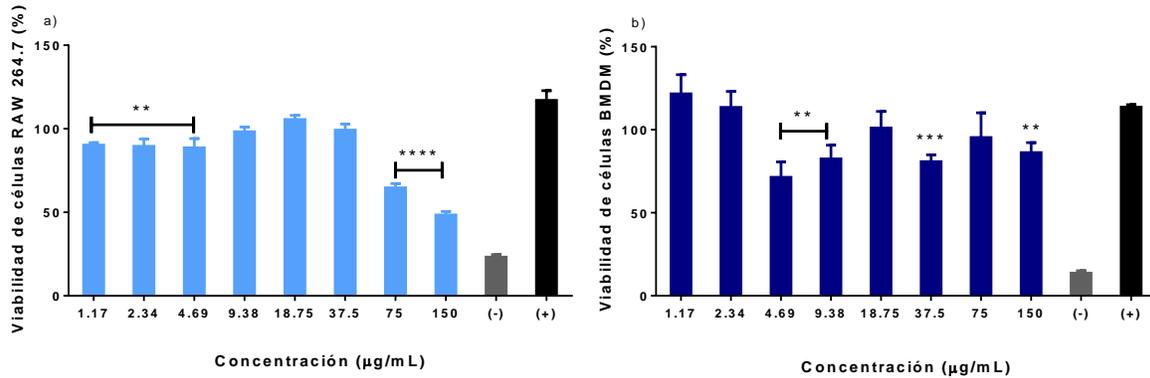
Para los experimentos de fagocitosis, los ensayos de viabilidad y los perfiles de citocinas se usó el ensayo de varianza de una vía (ANOVA) en experimentos independientes hechos por triplicado con la prueba de Fisher en el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Prism, v. 6.01, California, USA). Los modelos de infección *in vivo* fueron analizados con ANOVA de dos vías y la prueba de comparación múltiple de Dunnet. En los resultados se muestra el promedio de dichos experimentos con desviación estándar. La significancia se representó como $P = * < 0.05$, $** < 0.005$, $*** < 0.0005$, $**** < 0.0001$.

9. Resultados

Actividad *in vitro* de FA1

FA1 influye en la viabilidad de macrófagos y de Salmonella Typhimurium

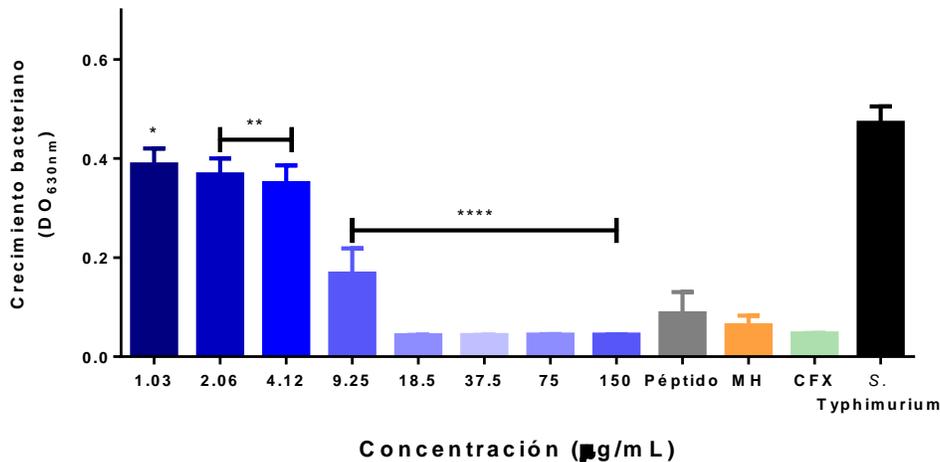
Previamente, se determinó que FA1 es tóxico para células RAW264.7 cuando se les trata con 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del péptido. Por lo que el primer paso para determinar la factibilidad de su uso es analizar el efecto que diferentes concentraciones de este tienen sobre bacterias y células eucariotas. Es así como se trató a células RAW264.7 y a macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) con diferentes concentraciones de FA1 [1.17-150 $\mu\text{g}/\text{mL}$] y se determinó el porcentaje de células vivas, **Gráfica 1**. Aquí se pudo observar que FA1 decrece la viabilidad de los BMDM a 4.69, 9.38, 37 y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Mientras que en células RAW264.7 el principal decremento de la viabilidad ocurrió con 75 y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FA1, reduciendo la población a por debajo de la mitad. Con esto se puede concluir que ciertas concentraciones de FA1 afectan de manera particular la viabilidad de los macrófagos.



Gráfica 1. FA1 altera la viabilidad de los macrófagos murinos. Se incubaron 10^5 de (a) RAW264.7 o (b) BMDM/pozo toda la noche con diferentes concentraciones de FA1 para determinar su efecto sobre la viabilidad celular. Control positivo (+): células sin estímulo; Control negativo (-): células lisadas con Tritón X-100. Se muestra el promedio \pm con desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos negros denotan diferencias significativas con respecto al control positivo. $p = ** < 0.01$, $*** < 0.001$, $**** < 0.0001$.

Por otro lado, se determinó mediante el ensayo de dilución seriada la concentración mínima inhibitoria a la que FA1 inhibe el crecimiento de *S. Typhimurium*. Fue así como se determinó que 18.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del péptido inhiben el crecimiento bacteriano. También se determinó que el efecto del péptido es bactericida, **Gráfica 2**. Con este resultado se puede indicar que FA1 es más tóxico

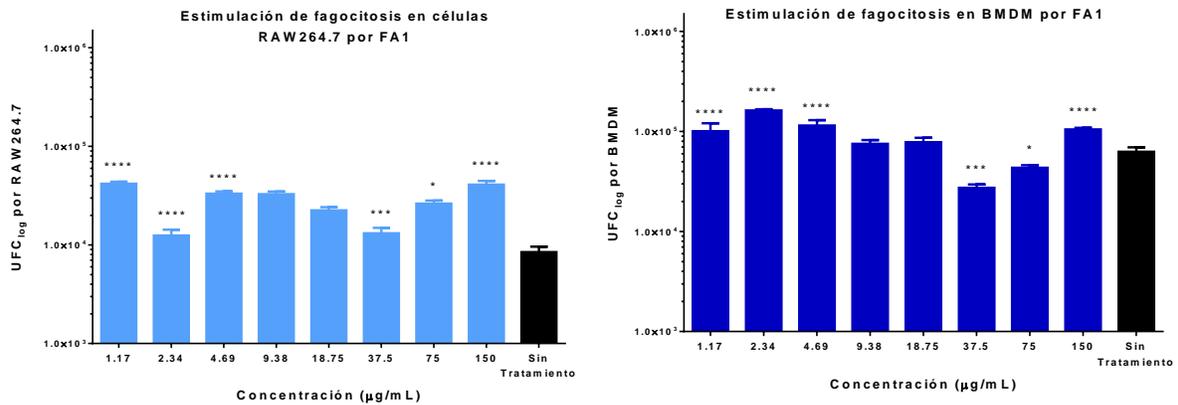
contra bacterias que contra células eucariotas, lo cual, sumado a su bajo índice hemolítico, lo posiciona como un buen agente para su uso en modelos *in vivo*.



Gráfica 2. El crecimiento de *Salmonella Typhimurium* se inhibe por FA1. Se incubó a *Salmonella Typhimurium* (10^8 cel/mL) con diluciones seriadas de FA1 [1.03-150 µg/mL] y se determinó qué concentración inhibe su crecimiento. **Péptido:** Péptidos sin bacteria; **MH:** Caldo Mueller-Hinton sin péptido ni bacteria; **CFX:** Ceftriaxona [10 µg/ml]; **S. Typhimurium:** Bacteria sin péptido ni antibiótico. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes hechos por triplicado (n=9). $p = * < 0.05$, $** < 0.01$, $**** < 0.0001$.

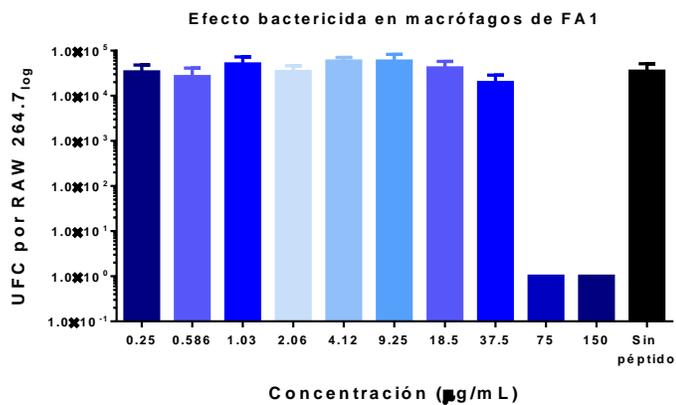
FA1 incrementa la actividad de los macrófagos

Para determinar si FA1 influye en la actividad fagocítica de los macrófagos se retó por 24 h a 10^5 células RAW264.7 y BMDM con diferentes concentraciones de FA1 [1.17-150 µg/mL]. Luego, se les infectó con 10^6 de *S. Typhimurium* ATCC14028 (MOI= 1:10) y se les lisó para recuperar las bacterias fagocitadas y calcular el número de estas, **Gráfica 3**. Las células RAW26.47 fagocitaron más bacterias cuando se les incubó con 1.17, 2.34, 4.69, 37.5, 75 y 150 µg/mL de péptido, siendo 150 y 1.17 µg/mL las concentraciones que principalmente estimularon dicho efecto. Mientras que las BMDM fagocitaron más bacterias cuando se les incubó con 1.17, 2.34, 4.69 y 150 µg/mL de FA1.



Gráfica 3. FA1 promueve la fagocitosis de *S. Typhimurium* por macrófagos murinos. Se retó a 10⁵ de RAW264.7 o BMDM/pozo en placas de 96-pozos con diferentes concentraciones de FA1 y se determinó si esto afecta su habilidad para fagocitar 10⁶ UFC de *S. Typhimurium*/pozo. Se muestra el promedio ± con desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo Sin Tratamiento. $p = * < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$, $**** < 0.0001$.

Es importante considerar que el mecanismo de patogenicidad de *S. Typhimurium* se basa en ser fagocitada por distintas células. Por lo que resulta importante el estudiar si FA1 incrementa la actividad bactericida de los macrófagos RAW264.7. Es así que se observó que altas concentraciones de FA1 (75 - 150µg/mL) erradican completamente el número de UFC recuperadas del interior de los macrófagos, **Gráfica 4**.



Gráfica 4. FA1 estimula el efecto bactericida de los macrófagos. Se determinó el efecto bactericida de macrófagos RAW264.7 [1 × 10⁵ cel/pozo] cuando se les reta con diferentes concentraciones de FA1 y se les infecta con *S. Typhimurium* (MOI 10:1). Se muestra el promedio y desviación estándar de tres replicados biológicos $p * < 0.05$, $*** < 0.001$.

Con esto, parece que FA1 estimula la actividad antimicrobiana de los macrófagos a diferentes concentraciones. Cabe mencionar que el efecto bactericida puede ser atribuido a la activación de los macrófagos o a la presencia de péptido dentro de dichas células, se requiere de más experimentos para determinar cuál de estas vías es la correcta.

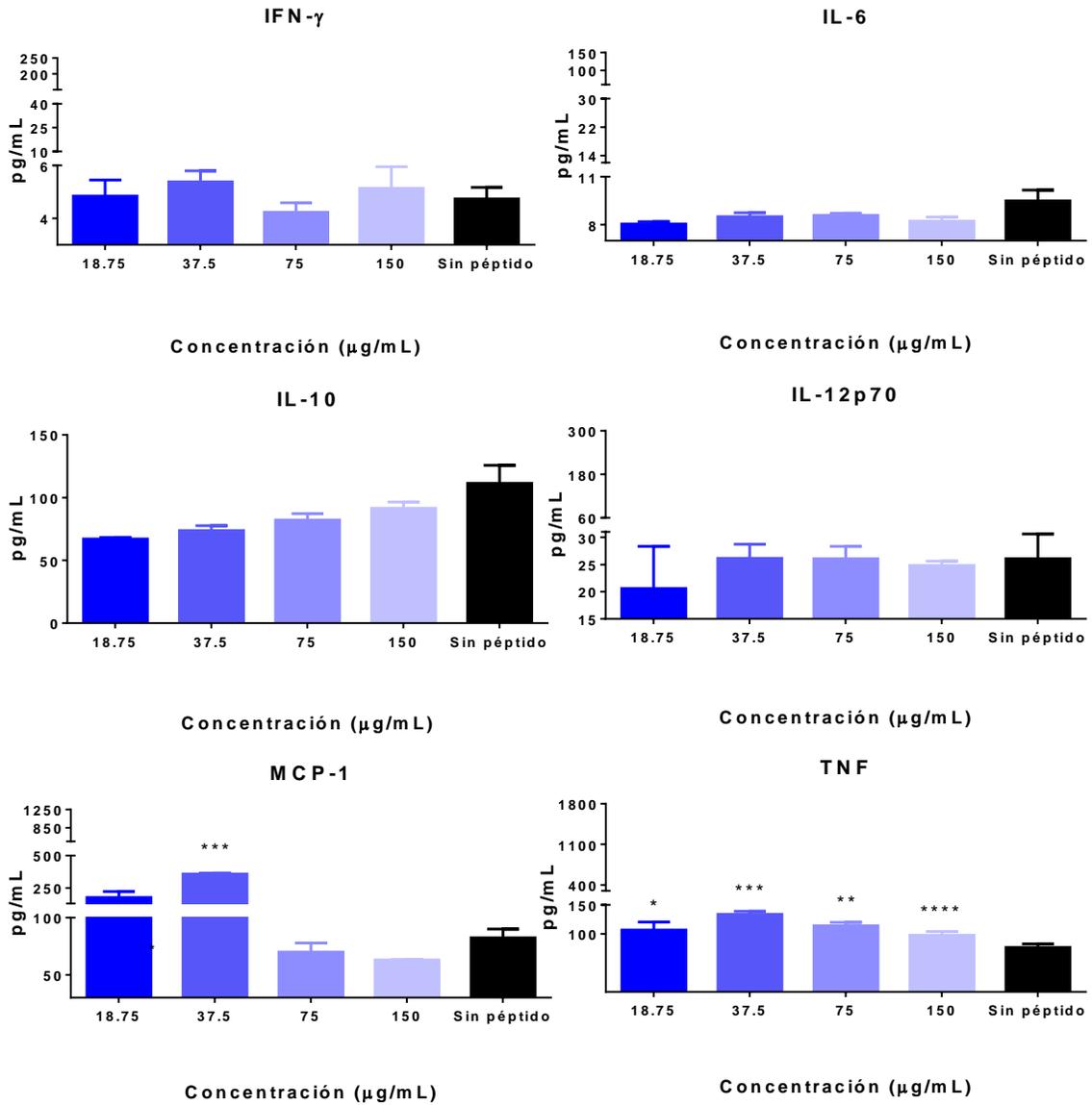
A lo largo de estos experimentos se colectaron los sobrenadantes de las células antes y después de la infección para su análisis por citometría de flujo. Con lo cual se realizó la determinación de perfiles de expresión de citocinas.

FA1 influye en los perfiles de expresión de citocinas de los macrófagos

Un aspecto importante en el control de la infección por *S. Typhimurium* por parte de los PDH, es la modulación de la respuesta inflamatoria al influir en los perfiles de expresión de citocinas. Para determinar si FA1 puede llevar acabo esto, se usó una estrategia de análisis múltiple por citometría de flujo con el kit *Cytometric bead array* (CBA) para analizar los cambios en la liberación de citocinas de los macrófagos RAW264.7 tras ser incubados por 24h con diferentes concentraciones de FA1 [18.75-150µg/mL], **Gráfica 5**, y tras el reto con *S. Typhimurium* durante 30 min, **Gráfica 6**. Como se puede observar, tras su incubación con 37.5 µg/ml FA1, los macrófagos presentaron un incremento en la expresión de MCP-1 y con 18.75-150 µg/ml causó un incremento de TNF. Lo cual refiere a un estímulo de la actividad inflamatoria y quimiotáctica.

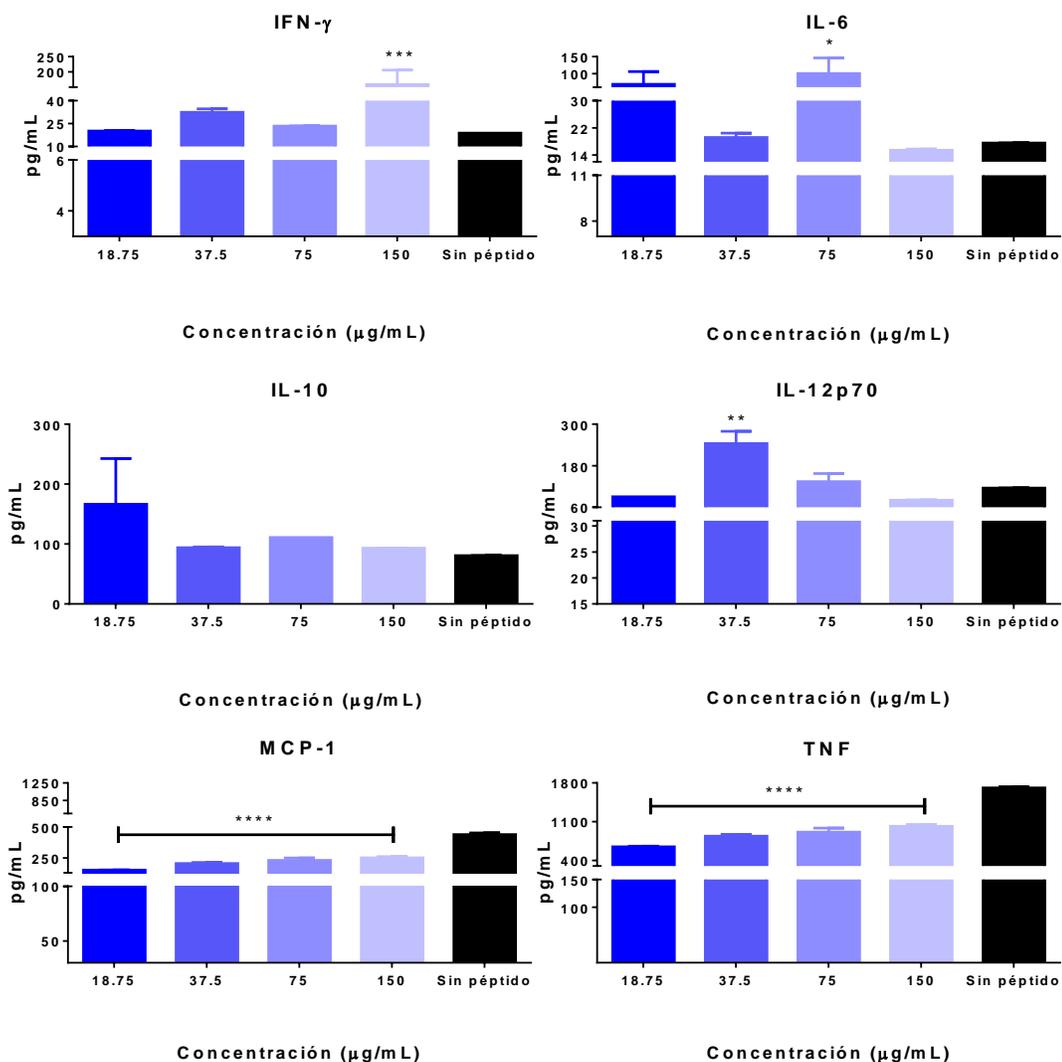
Por otro lado, se observó que después de la infección hay un incremento en la expresión de IFN- γ , IL-16 e IL-12p70 en células retadas con FA1. Esto refiere a un incremento en la actividad proinflamatoria y a la activación de mecanismos para inhibir el crecimiento de patógenos intracelulares. Al mismo tiempo, las citocinas MCP-1 y TNF disminuyeron su expresión cuando se les incubó con 18.75-150µg/ml de FA1, con lo que se entiende que la actividad inflamatoria y quimiotáctica disminuyó.

Con esto se puede hablar de un incremento en el perfil de expresión de citocinas inflamatorias en macrófagos incubados con FA1.



Gráfica 5. FA1 incrementa la expresión de citocinas inflamatorias en macrófagos RAW264.7 sin infección previa.

Se analizó el perfil de citocinas de macrófagos RAW264.7 retados con diferentes concentraciones de FA1. Esto se hizo con el *BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit* en un citómetro de flujo acústico Attune NxT. Se registraron 10,000 eventos con un flujo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Se muestra el promedio \pm con desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo Sin péptido. $p = * < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$.



Gráfica 6. FA1 estimula un perfil de citocinas inflamatorias en macrófagos infectados con *S. Typhimurium*. Se analizó el perfil de citocinas de macrófagos RAW264.7 estimulados con diferentes concentraciones de FA1 e infectados con *S. Typhimurium*. Esto mediante citometría de flujo en un Attune NxT Acoustic Flow cytometer con el kit BD Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit. Se registraron 10,000 eventos a una velocidad de 100 μL/min. Se muestra el promedio ± con desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo sin péptido. $p = * < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$, $**** < 0.0001$.

En la **Tabla 1** se puede observar, a manera de resumen, los perfiles de citocinas de las células RAW 264.7 antes y después de ser infectadas.

		Sin infección						Con infección					
Concentración µg/ml		IL-6	IL-10	IFN	IL-12p70	MCP-1	TNF	IL-6	IL-10	IFN	IL-12p70	MCP-1	TNF
FA1	18.75	=	=	=	=	=	↑	=	↑	=	=	↓	↓
	37.5	=	=	=	=	↑	↑	=	=	=	↑	↓	↓
	75	=	=	=	=	=	↑	↑	=	=	=	↓	↓
	150	=	=	=	=	=	↑	=	=	↑	=	↓	↓

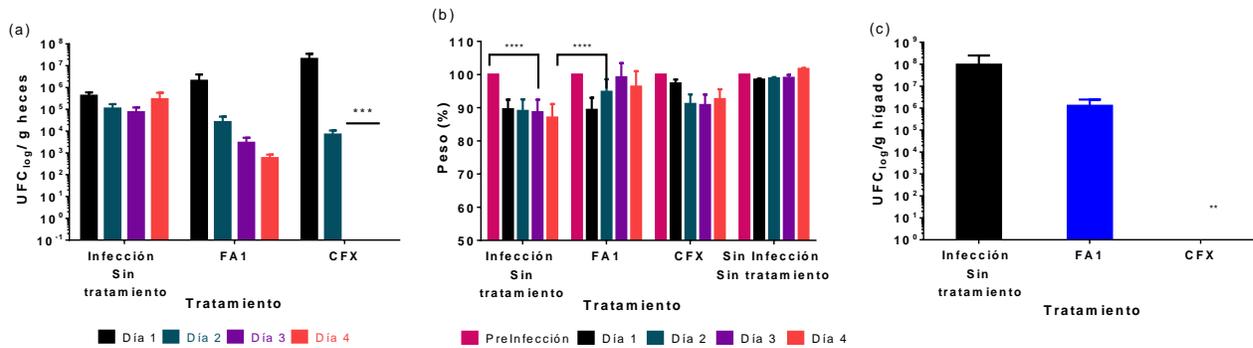
Tabla 1. FA1 influye en los perfiles de expresión de citocinas de macrófagos. Se muestran los perfiles de citocinas tras el tratamiento con diferentes concentraciones de FA1 en los grupos Sin infección y Con infección. **Decremento:** flecha azul; **Incremento:** flecha roja; **Ausencia de cambio:** signo de igual.

Actividad *in vivo* de FA1

FA1 decrece la infección gastrointestinal por Salmonella Typhimurium

La finalidad del desarrollo de nuevos antimicrobianos yace en su aplicación *in vivo*, para lo que se debe de estudiar su actividad en organismos complejos. Es por esto que se analizó el efecto antimicrobiano e inmunomodulador de FA1 [5 mg/kg] en un modelo murino de infección gástrica por *S. Typhimurium*. Se usó ceftriaxona [CFX=70 mg/kg] como control, dado que es el antibiótico de elección para tratar infecciones por *S. Typhi* y *S. Typhimurium*, además de ratones infectados sin tratamiento como control de la evolución natural de la infección, **Gráfica 7**.

Se puede observar que el tratamiento con FA1 redujo la carga bacteriana con respecto al control de infección, aunque no logró resolver la infección, **Gráfica 7a**. De igual forma, se observó que los ratones que recibieron FA1 lograron recuperar el peso a partir del segundo día, **Gráfica 7b**. Cabe mencionar que el tratamiento con ceftriaxona no favoreció la recuperación o aumento de peso. Finalmente, FA1 no impidió que la infección avanzara y colonizara el hígado, **Gráfica 7c**, lo cual indica que la infección abandonó el intestino para volverse sistémica. Con esto podemos observar que, si bien el péptido funciona adecuadamente a nivel *in vitro*, este resultado no puede extrapolarse directamente a un modelo *in vivo*, posiblemente debido la incorrecta distribución del péptido.



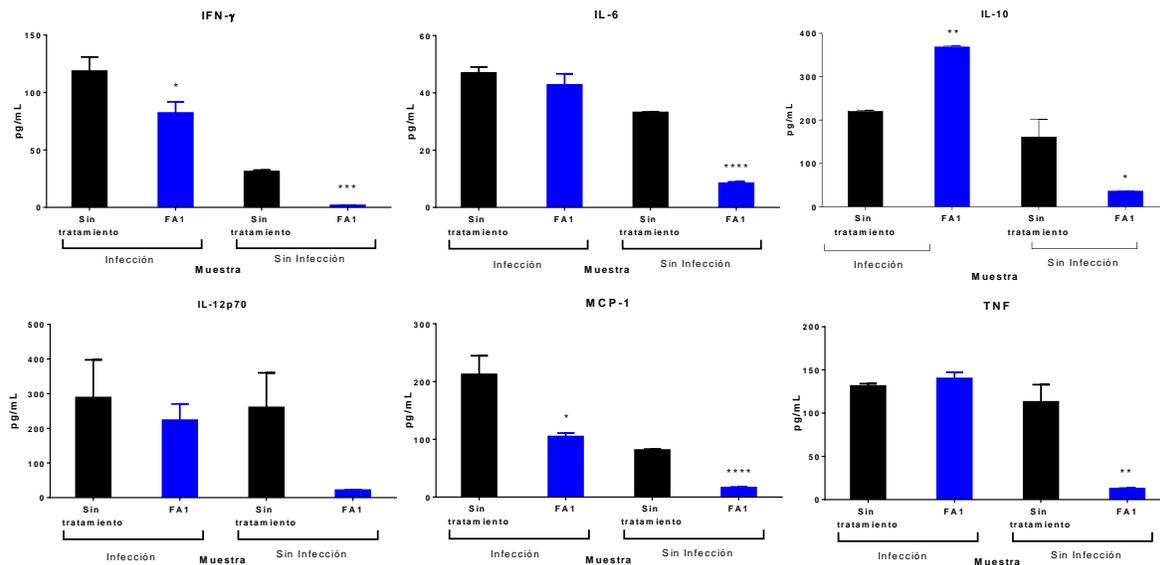
Gráfica 7. FA1 decrece la infección gastrointestinal por *S. Typhimurium*. a) Recuento bacteriano en heces; b) Evolución del peso de los ratones durante la infección; c) Recuento bacteriano en hígado. Se usaron grupos de Infección sin tratamiento; Infectados tratados con FA1 [5mg/kg]; e Infectados tratados con CFX [70mg/kg]. Se muestra el promedio \pm y desviación estándar de tres experimentos independientes con tres individuos cada uno. Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo sin tratamiento. $p = ** < 0.01$, $*** < 0.0005$, $**** < 0.0001$.

Cabe mencionar que durante el tiempo que duró el tratamiento, si bien los grupos de animales que recibieron el tratamiento con péptidos no erradicaron la infección, sí mantuvieron una conducta que no reflejaba una infección; esto es, no se observó pelo erizado, encorvamiento o alteración morfológica de heces como sí se observó en el control sin tratamiento. Con esto, se puede concluir que FA1 no puede inhibir el proceso infeccioso, pero sí disminuye la cantidad de bacterias infectantes y la pérdida de masa corporal.

FA1 modifica el perfil de expresión de citocinas en plasma de ratones infectados con *Salmonella Typhimurium*

Tras el tratamiento con los péptidos se determinó el perfil de expresión de las citocinas IFN, IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP1 y TNF en plasma, **Gráfica 8**. Se observó que FA1 disminuye la expresión de IFN- γ y MCP1, al mismo tiempo que incrementa la de IL-10, lo que se entiende como un efecto antiinflamatorio semejante al observado *in vitro*, aunque a diferente concentración ($18.5 \mu\text{g/mL}$ *in vitro* y $5\text{mg/kg} \approx 100 \mu\text{g}$, *in vivo*).

En la **Tabla 2** se puede observar de forma resumida el perfil de citocinas plasmáticas resultante de la administración del péptido FA1 en presencia y ausencia de un proceso infeccioso.



Gráfica 8. FA1 promueve un perfil de expresión de citocinas plasmáticas antiinflamatorio. Se analizó el perfil de citocinas en plasma de los ratones infectados con *S. Typhimurium* y tratados vía intravenosa con FA1 [5mg/kg] mediante citometría de flujo usando un *Attune NxT Acoustic flow cytometer* con el kit BD cytometric Bead Array. Se registraron 10, 000 eventos a una velocidad de 100 μ L/min. Se muestra el promedio de dos experimentos independientes con desviación estándar. Los asteriscos denotan cambios significativos. $p = * < 0.05$, $** < 0.005$, $*** < 0.0005$, $**** < 0.0001$.

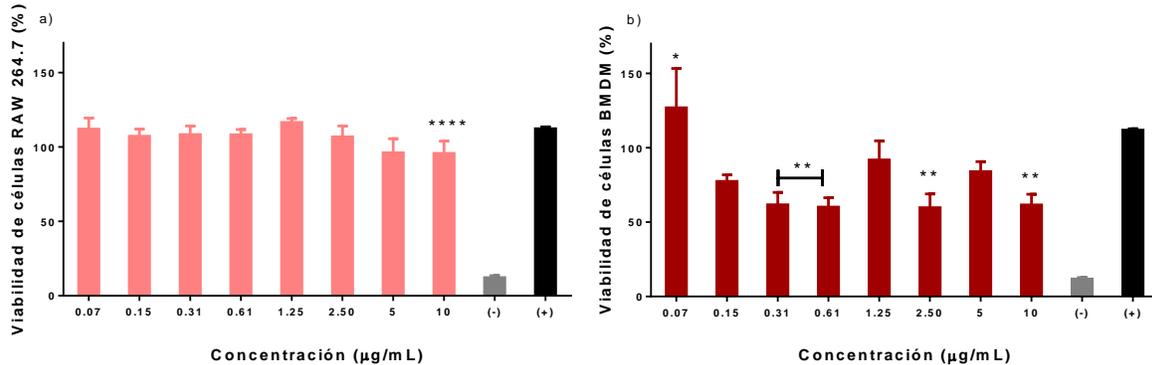
	Sin infección						Infectado					
	IFN	IL-6	IL-10	IL-12p70	MCP-1	TNF	IFN	IL-6	IL-10	IL-12p70	MCP-1	TNF
FA1 [5mg/kg]	↓	↓	↓	=	↓	↓	↓	=	↑	=	↓	=

Tabla 2. Perfil de expresión de citocinas en modelos *in vivo*. Se muestra a manera de resumen los perfiles de citocinas presentes en plasma de ratones tratados con FA1 con relación a los grupos infectados y sin infección. **Decremento:** flecha negra; **Incremento:** flecha roja; **Falta de cambio:** signo de igual.

Actividad *in vitro* de Pin2[G]

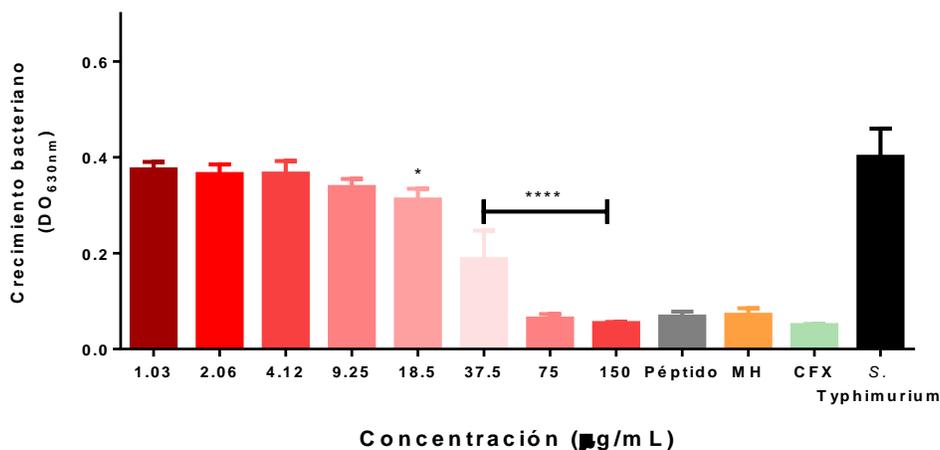
Pin2[G] influye en la viabilidad de macrófagos y de S. Typhimurium

Se tenía como antecedente el efecto citotóxico de Pin2[G] contra eritrocitos, células RAW264.7 y HBE a concentraciones superiores a 20 $\mu\text{g/mL}$. Por lo que para establecer la factibilidad de su uso en modelos eucarióticos se incubó a células RAW264.7 y BMDM con diferentes concentraciones de Pin2[G] [0.07-10 $\mu\text{g/mL}$]. Además de que también se determinó su MIC contra *S. Typhimurium*. En lo referente a los modelos eucarióticos, se observó que las concentraciones analizadas de Pin2[G] no decrecen la viabilidad de las células RAW264.7, pero sí afecta a la de los macrófagos derivados de médula ósea, principalmente con 0.61, 2.5 y 10 $\mu\text{g/mL}$, **Gráfica 9**.



Gráfica 9. Pin2[G] altera la viabilidad de los macrófagos murinos. Se incubaron 10^5 de RAW264.7 o BMDM/pozo toda la noche con diferentes concentraciones de Pin2[G] para determinar su efecto sobre la viabilidad celular. Control positivo: células sin estímulo; Control negativo: células lisadas con Tritón X-100. Se muestra el promedio \pm con desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al control positivo. $p = ** < 0.01$, $*** < 0.001$, $**** < 0.0001$.

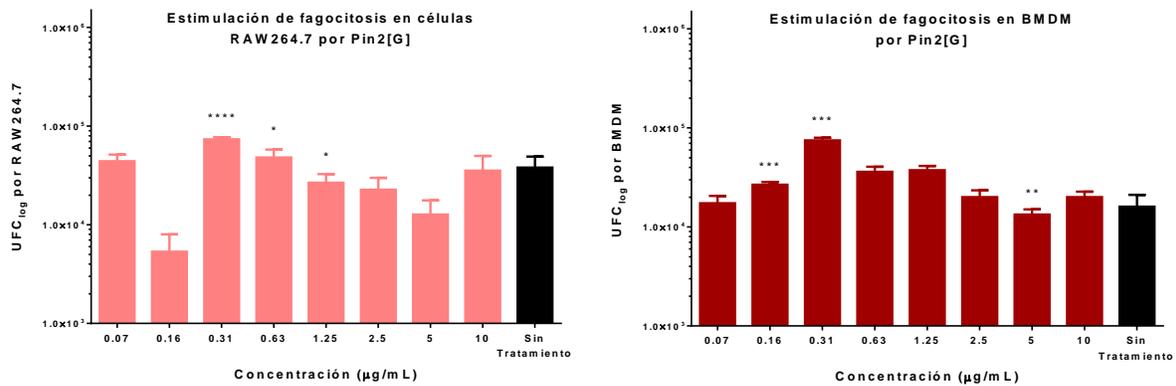
Por otro lado, de antemano se sabía del efecto antimicrobiano de Pin2[G] contra ciertas bacterias Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, en este caso, se demostró que también inhibe el crecimiento de *Salmonella Typhimurium* a 75 µg/ml y que tiene efecto bactericida, **Gráfica 10**.



Gráfica 10. El crecimiento de *Salmonella Typhimurium* se inhibe por Pin2[G]. Se incubó a *Salmonella Typhimurium* (10^8 cel/mL) con diluciones seriadas de Pin2[G] por 18 h. **Péptido:** Péptidos sin bacteria; **MH:** Caldo Mueller-Hinton sin péptido o bacteria; **CFX:** Ceftriaxona [10 µg/ml] con *S. Typhimurium*; **S. Typhimurium:** Bacteria sin péptido o antibiótico. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes hechos por triplicado (n=9). $p = * < 0.05$, $** < 0.01$, $**** < 0.0001$.

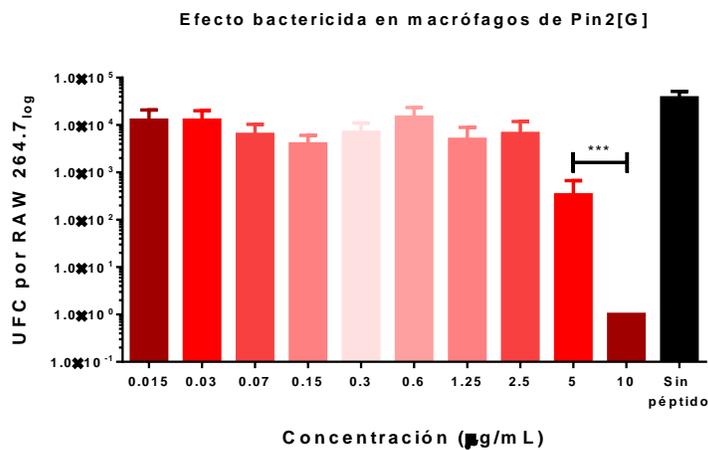
La actividad fagocítica y bactericida de los macrófagos es influenciada por Pin2[G]

Durante los estudios previos de las propiedades inmunitarias de Pin2[G], se observó que estimula la expresión de receptores tipo Toll-2 y -4, así como de NOD-2. Esto podría verse reflejado en un incremento en la fagocitosis de *S. Typhimurium* por células RAW264.7 retadas con este péptido. Como se puede observar en la **Gráfica 11**, las células RAW264.7 y las BMDM incrementan su actividad fagocítica cuando son activados con concentraciones de entre 0.16-1.25 µg/mL de Pin2[G], siendo 0.31 µg/mL la concentración de péptido que más incrementa dicho efecto. Es así como se puede observar que Pin2[G] activa la capacidad fagocítica de los macrófagos cuando están presentes concentraciones específicas del péptido.



Gráfica 11. Pin2[G] promueve la fagocitosis de *S. Typhimurium* por macrófagos murinos. Se retó a 10⁵ cel/pozo en placas de 96-pozos con diferentes concentraciones de Pin2[G] [0.07-10 µg/mL] y se determinó si esto afecta su habilidad para fagocitar 10⁶ UFC de *S. Typhimurium*/pozo. Se muestra el promedio ± con desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo Sin Tratamiento. $p = * < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$, $**** < 0.0001$.

Al igual que con FA1, es necesario saber si el incremento en la fagocitosis se refleja en un incremento en la actividad bactericida por parte de los macrófagos, para lo cual se siguió el mismo protocolo con Pin2[G]. Se puede observar en la **Gráfica 12** que altas concentraciones de Pin2[G] [5-10 µg/ml] decrecen de forma significativa el número de UFC que pueden ser recuperadas del interior de los macrófagos, siendo 10 µg/mL la concentración a la que ya no se recuperan bacterias de los macrófagos.



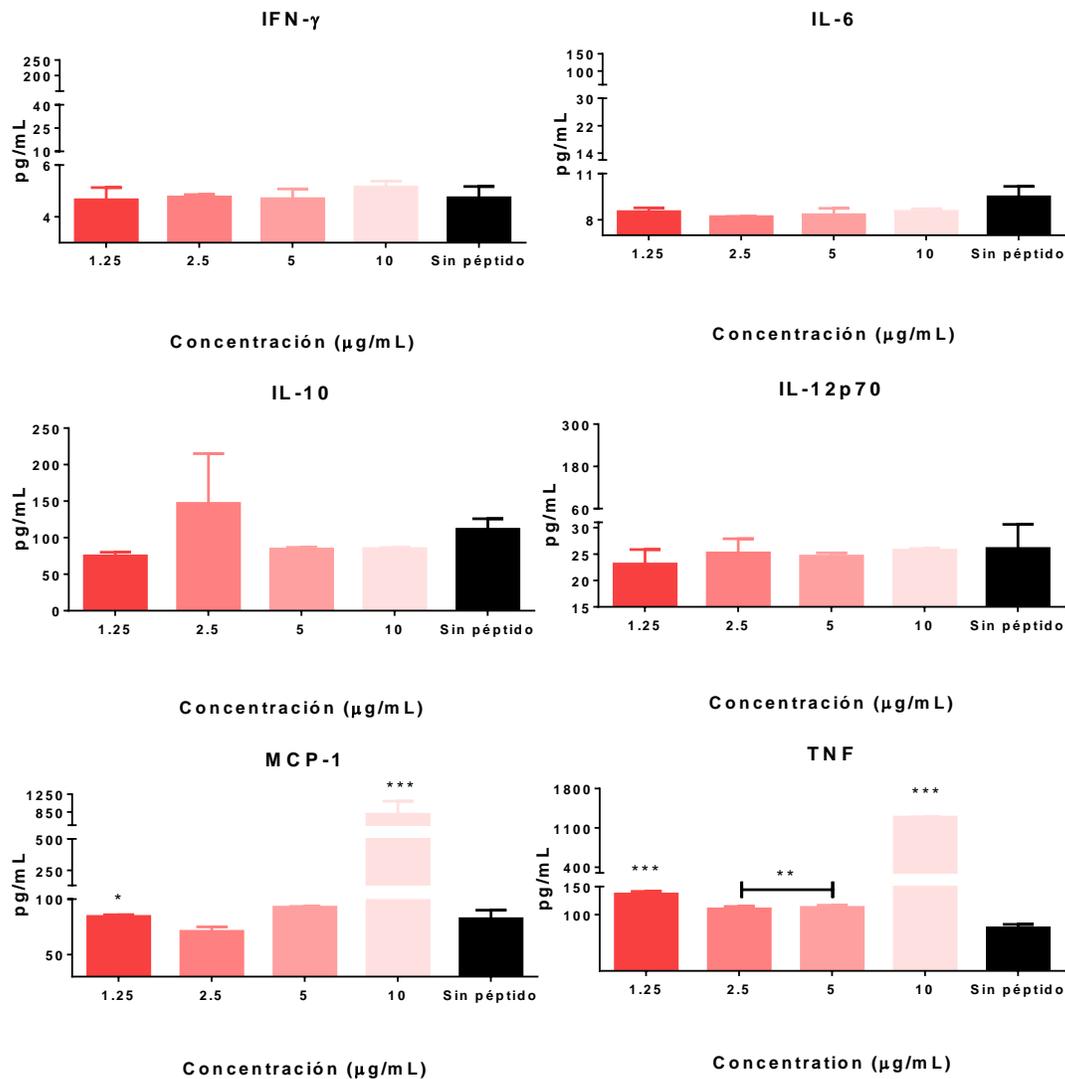
Gráfica 12. Efecto bactericida en macrófagos. Se determinó el número de UFC de *S. Typhimurium* restantes tras haber sido incubadas por 16 h con macrófagos RAW264.7 (1x10⁵ cel/pozo) previamente retados durante 18 h con diferentes concentraciones de Pin2[G] [0.015-10 µg/mL]. Se muestra el promedio y desviación estándar de tres replicados biológicos $p = * < 0.05$, $*** < 0.001$.

Resulta interesante que las concentraciones de Pin2[G] que promueven la fagocitosis (0.16-1.25 $\mu\text{g/mL}$), difieren de las que incrementan el efecto bactericida (5-10 $\mu\text{g/mL}$). Pareciera así que el incremento de la fagocitosis no está relacionado con el incremento del efecto bactericida.

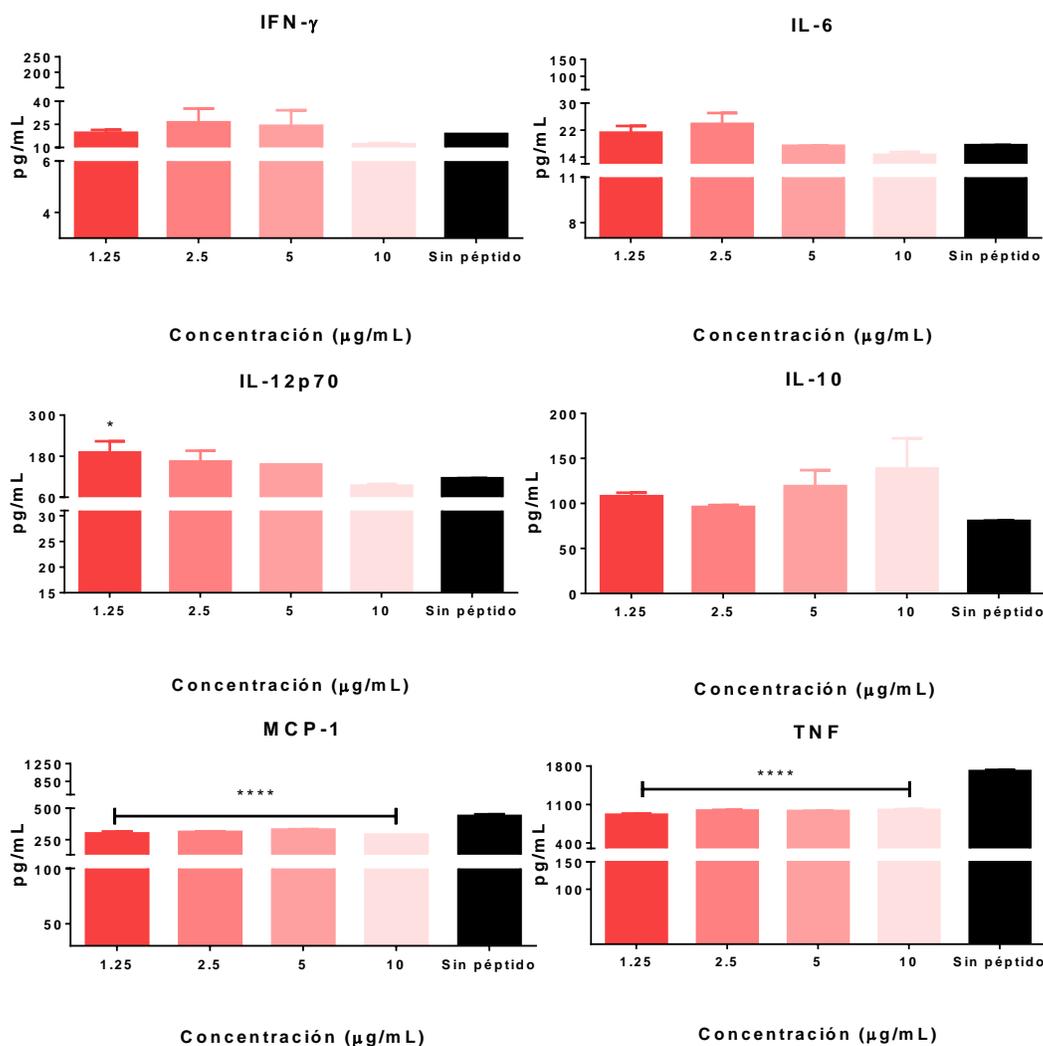
Pin2[G] influye en los perfiles de expresión de citocinas de macrófagos RAW264.7

Previamente se ha demostrado que Pin2[G] promueve la expresión de citocinas inflamatorias en macrófagos RAW264.7 y células HBE. Así que para determinar la influencia de Pin2[G] sobre la expresión de citocinas se incubaron células RAW264.7 con las concentraciones de Pin2[G] [1.25-10 $\mu\text{g/mL}$] que incrementaron el efecto bactericida.

Como se puede observar, **Gráfica 13**, cuando se reta a las células con 1.25 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de Pin2[G] se estimula la producción de MCP-1, mientras que, concentraciones de 1.25 a 10 $\mu\text{g/mL}$ estimulan la producción de TNF. Con lo que se puede hablar de una tendencia a favorecer un ambiente inflamatorio. Mientras que, cuando las células se retan con 1.25 $\mu\text{g/mL}$ de Pin2[G] y se infectan con *S. Typhimurium* se incrementa la expresión de IL-12p70. Mientras que en estas mismas células disminuyó la expresión de MCP-1 y TNF, **Gráfica 14**.



Gráfica 13. Pin2[G] incrementa la expresión de citocinas de MCP-1 y TNF en macrófagos RAW264.7. Se analizó el perfil de citocinas de macrófagos RAW264.7 retados con Pin2[G] [1.25 - 10 μg/mL]. Esto se hizo con el *BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit* en un citómetro de flujo acústico Attune NxT. Se registraron 10,000 eventos con un flujo de 100 μL/min. Se muestra el promedio ± con desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo Sin péptido. $p = * < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$.



Gráfica 14. Pin2[G] promueve la liberación de IL-12p70 en macrófagos infectados con *S. Typhimurium*.

Mediante citometría de flujo se analizó el perfil de citocinas de macrófagos RAW264.7 estimulados con diferentes concentraciones de Pin2[G] e infectados con *S. Typhimurium*. Se usó un Attune NxT Acoustic low cytometer con el kit BD Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit. Se registraron 10,000 eventos a una velocidad de 100 μL/min. Se muestra el promedio ± con desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo sin péptido. $p = * < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$, $**** < 0.0001$.

En la **Tabla 3** se resumen los resultados de los perfiles de expresión de citocinas en células infectadas y no infectadas.

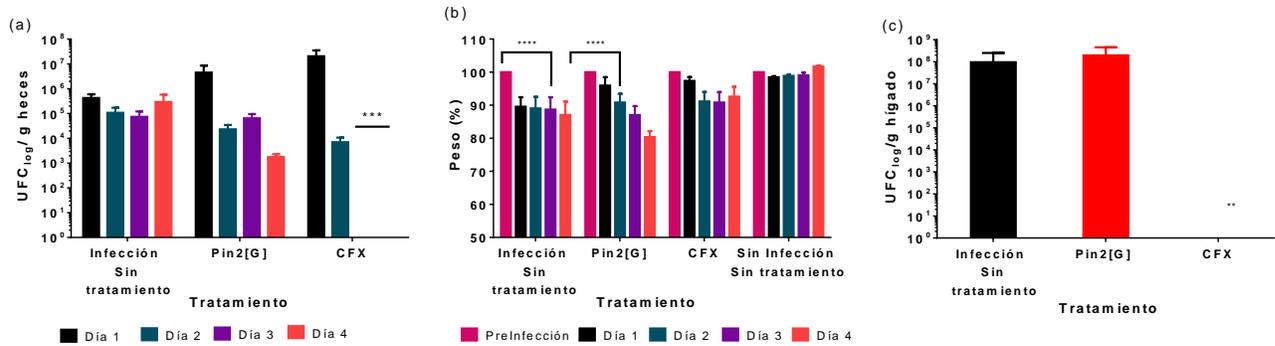
		Sin infección						Con infección					
Concentración µg/ml		IL-6	IL-10	IFN	IL-12p70	MCP-1	TNF	IL-6	IL-10	IFN	IL-12p70	MCP-1	TNF
Pin2[G]	1.25	=	=	=	=	=	↑	=	=	=	↑	↓	↓
	2.5	=	=	=	=	=	↑	=	=	=	=	↓	↓
	5	=	=	=	=	=	↑	=	=	=	=	↓	↓
	10	=	=	=	=	↑	↑	=	=	=	=	↓	↓

Tabla 3. Perfil de expresión de citocinas en macrófagos de ratón. Se muestran los perfiles de citocinas tras el tratamiento con diferentes concentraciones de Pin2[G] en los grupos sin infección y con infección. **Decremento:** flecha azul; **Incremento:** flecha roja; **Ausencia de cambio:** signo de igual.

Actividad in vivo de Pin2[G]

Pin2[G] decrece la infección gastrointestinal por Salmonella Typhimurium

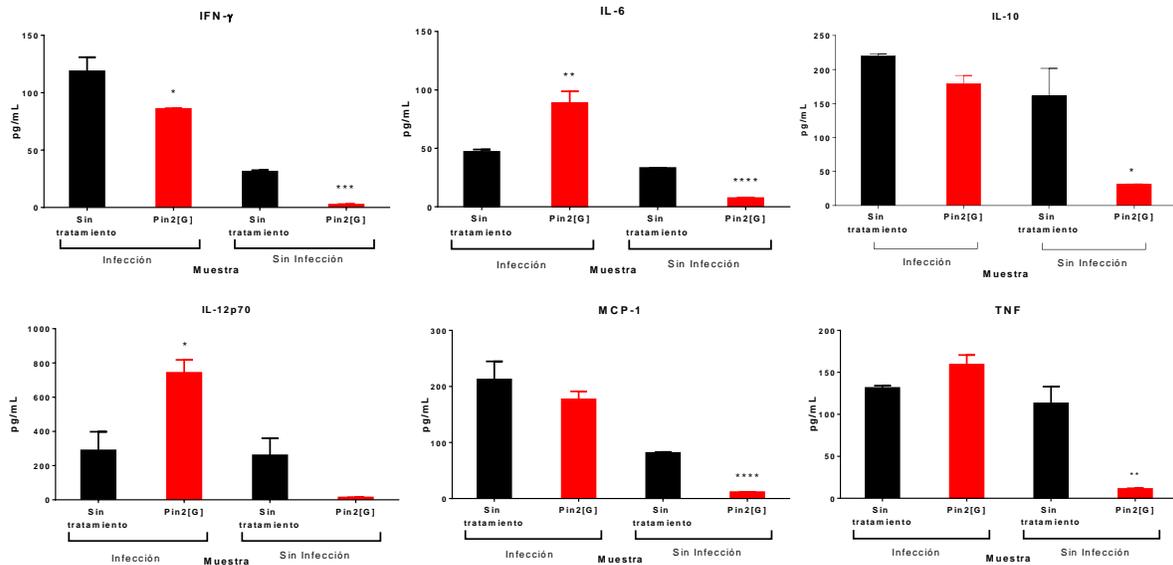
Dado que Pin2[G] inhibe el crecimiento de *S. Typhimurium in vitro* y que estimula la producción de IL-12p70 en macrófagos RAW264.7 se decidió usarlo como tratamiento contra una infección gástrica por *Salmonella Typhimurium* y determinar su efecto inmunitario a nivel *in vivo*. Para esto, se administraron 2.5mg/kg de péptido vía intravenosa a ratones BALB/c infectados y se registró la evolución de la infección mediante recuento bacteriano en heces e hígado, así como su cambio de peso, **Gráfica 15**. Se observó un decremento en el número de bacterias en heces, aunque esto no llegó a ser significativo, **Gráfica 15a**. Además, los ratones tratados con Pin2[G] perdieron más peso que los que no recibieron tratamiento, **Gráfica 15b**. Al finalizar el tratamiento se recuperó una cantidad similar de UFCs del hígado de los ratones tratados de los que no recibieron tratamiento, **Gráfica 15c**. Con esto se concluye que Pin2[G] tampoco logra resolver la infección *in vivo*.



Gráfica 15. Pin2[G] decrece la infección gastrointestinal por *S. Typhimurium*. a) Recuento bacteriano en heces; b) Evolución del peso de los ratones durante la infección; c) Recuento bacteriano en hígado. Se muestran grupos de Infección sin tratamiento; Infectados tratados con Pin2[G] [2.5mg/kg] e Infectados tratados con CFX [70mg/kg]. Se muestra el promedio \pm y desviación estándar de tres experimentos independientes con tres individuos cada uno. Los asteriscos denotan diferencias significativas con respecto al grupo sin tratamiento. $p = ** < 0.01$, $*** < 0.0005$, $**** < 0.0001$.

Pin2[G] modifica el perfil de expresión de citocinas en plasma de ratones infectados con Salmonella Typhimurium

Durante la determinación de citocinas plasmáticas en ratones infectados con *Salmonella Typhimurium* y tratados con Pin2[G], **Gráfica 16** y **Tabla 4**, se observó que la aplicación del péptido estimula la producción de IL-6 e IL-12p70, lo cual refiere a un perfil inflamatorio; al mismo tiempo, se observa un decremento en la producción de IFN- γ . Con esto se puede concluir que Pin2[G] podría favorecer un ambiente inflamatorio.



Gráfica 16. Pin2[G] promueve un perfil de expresión de citocinas plasmáticas inflamatorio. Se analizó el perfil de citocinas en plasma de ratones infectados con *S. Typhimurium* y tratados con Pin2[G] (5mg/kg) mediante citometría de flujo usando un *Attune NxT Acoustic flow cytometer* con el kit BD cytometric Bead Array. Se registraron 10, 000 eventos a una velocidad de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Se muestra el promedio de dos experimentos independientes con desviación estándar. Los asteriscos denotan cambios significativos. $P = * < 0.05$, $** < 0.005$, $*** < 0.0005$, $**** < 0.0001$.

	Sin infección						Infectado					
	IFN	IL-6	IL-10	IL-12p70	MCP-1	TNF	IFN	IL-6	IL-10	IL-12p70	MCP-1	TNF
Pin2[G] _[2.5mg/kg]	↓	↓	↓	=	↓	↓	↓	↑	=	↑	=	=

Tabla 4. Perfil de expresión de citocinas en modelos *in vivo*. Se muestra a manera de resumen los perfiles de citocinas presentes en plasma de ratones tratados con Pin2[G] o FA1 con relación a los grupos infectados y sin infección. **Decremento:** flecha negra; **Incremento:** flecha roja; **Falta de cambio:** signo de igual.

Uso en conjunto de Pin2[G] y FA1

La mezcla de FA1 y Pin2[G] tiene efecto aditivo contra el crecimiento de S. Typhimurium

Se determinó el efecto de la mezcla de los péptidos Pin2[G] y FA1 sobre el crecimiento de *Salmonella Typhimurium*. Para esto se tuvo como referencia el valor de la concentración mínima inhibitoria determinada previamente, **Gráficas 2 y 8**, y a partir de este valor se usaron concentraciones decrecientes de ambos péptidos para hacer las mezclas. Es así como se mezclaron 0.59-75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Pin2[G] con 0.58-37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FA1. En la **Tabla 5** se muestran las diferentes combinaciones de péptidos y el efecto que tuvieron sobre el crecimiento bacteriano. En verde y con cuatro asteriscos se resaltan a aquellas combinaciones que inhibieron completamente

el crecimiento bacteriano, mientras que las que tienen tres y dos asteriscos solo lo decrecieron, siendo las que tienen un asterisco las que menos eficacia tuvieron al detener el crecimiento bacteriano.

Si bien todas las mezclas afectaron el crecimiento bacteriano de forma significativa, la combinación que menos requiere de ambos péptidos para inhibir el crecimiento bacteriano es la de 37.5 µg/mL de Pin2[G]+9.25 µg/mL de FA1. Sin embargo, al calcular el índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) se determinó que la mezcla de péptidos tiene un efecto aditivo, con lo que se descarta un efecto sinérgico entre ellos.

Péptidos		Pin2[G] (µg/ml)							
		75	37.5	18.75	9.38	4.69	2.34	1.17	0.59
FA1 (µg/ml)	37	****	****	****	****	****	****	**	***
	18.5	****	****	**	**	*	***	*	***
	9.25	****	****	*	**	*	**	*	*
	4.63	****	**	**	***	**	***	**	***
	2.31	**	*	*	*	**	**	**	**
	1.16	*	*	**	**	**	***	*	**
	0.58	***	*	*	**	**	**	*	*

Tabla 5. Efecto combinado de Pin2[G] con FA1. Por dilución seriada se estudió el efecto de diferentes mezclas de Pin2[G] (0.59-75 µg/mL) con FA1 (0.58-37 µg/mL) contra *S. Typhimurium* (10⁸cel/mL). En todos los casos, hubo un decremento en el crecimiento bacteriano, siendo los cuadros verdes: inhibición completa; verde claro: inhibición parcial; Amarillo: decremento; rojo: bajo decremento. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes. $p^* < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$, $**** < 0.0001$.

La mezcla de los péptidos no interfiere en la viabilidad de los macrófagos

Dado que se observó que FA1 y Pin2[G] afectan la viabilidad de células RAW264.7. Se procedió a determinar si su acción conjunta afecta de igual forma a las células. Para lo cual se retó a dichas células con mezclas de diferentes concentraciones de Pin2[G] (0.6-75 µg/mL) con FA1 (0.3-37 µg/mL) y se determinó cómo afectan a su viabilidad tras 24 horas de incubación. Como control negativo de viabilidad se aplicaron 10 µL de Tritón 10% a las células.

En la **Tabla 6** se puede observar que ciertas concentraciones de Pin2[G]+FA1 decrecen la viabilidad de las células más que otras, principalmente aquellas que involucran 75 µg/mL de Pin2[G] y 37 µg/mL de FA1. Hay que resaltar que la mezcla que parece afectar más a la viabilidad de estas células es la de 37.5 µg/ml de Pin2[G]+37 µg/ml de Pin2[G]. Resulta de

llamar la atención que la mezcla de 1.2 µg/ml de Pin2[G] + 2.3 µg/ml de FA1 también decrece de manera significativa la viabilidad celular.

Con esto, se puede decir que, a diferencia de lo que ocurre en bacterias, la combinación de ambos péptidos no afecta la viabilidad de los macrófagos.

Péptidos		Pin2[G] (µg/ml)								Control (-)
		75	37.5	18.8	9.4	4.7	2.3	1.2	0.6	
FA1 (µg/ml)	37	**	****	n.s.	n.s.	**	**	*	**	****
	18.5	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	**	****
	9.3	**	n.s.	****						
	4.6	*	n.s.	****						
	2.3	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	****
	1.2	**	n.s.	****						
	0.6	**	n.s.	****						
	0.3	**	**	*	n.s.	n.s.	n.s.	**	**	****

Tabla 6. Efecto de la combinación de los péptidos sobre la viabilidad de macrófagos RAW 264.7. Por dilución seriada se estudió el efecto de diferentes mezclas de Pin2[G] (0.6-75 µg/mL) con FA1 (0.3-37 µg/ml) sobre la viabilidad de células RAW 264.7 (10^5 cel/mL). En cuadros verdes: inhibición completa; Cuadro amarillo: decremento; Cuadro rosa: bajo decremento; Cuadro rojo (n. s.): Sin cambios; Control (-): Células lisadas con Tritón 10%. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes. p * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001, **** < 0.0001.

Tomando en cuenta los resultados de la combinación de péptidos, se determinó administrar la combinación de 2.34 µg/mL de Pin2[G] más 18.5 µg/ml de FA1 en ratones infectados con *Salmonella* Typhimurium. Esto teniendo en cuenta la reducción del crecimiento bacteriano y que concentraciones más altas de la mezcla resultan tóxicas para los ratones. Considerando la concentración de ambos antimicrobianos y el volumen sanguíneo de un ratón, se estableció que el tratamiento se realizaría con 0.8 mg/kg de FA1 y 0.1 mg/kg de Pin2[G]. Sin embargo, se observó que la administración conjunta de los péptidos resulta ser tóxica para los ratones, además de que no tiene ningún beneficio sobre la resolución de la infección, por lo que no se continuó con el uso de la combinación de péptidos *in vivo*.

10. **Discusión**

La capacidad de los péptidos antimicrobianos para inhibir el crecimiento bacteriano resulta de interés para comprender su papel en la resolución de procesos infecciosos. Ya que, además de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, se ha demostrado que moldean la microbiota bacteriana en mamíferos, insectos y plantas (Lazzaro *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021). Sin embargo, existen péptidos que carecen de efecto antimicrobiano, pero que logran finalizar con el proceso infeccioso al influir sobre la respuesta inmune mediante la regulación de la liberación de moléculas inflamatorias, la estimulación de la proliferación o la diferenciación de ciertos linajes celulares, etc. Los péptidos que cumplen con estas características son denominados “Péptidos de defensa del huésped” (Bacalum *et al.*, 2015; Fusco *et al.*, 2017; Wuerth *et al.*, 2017; Alexandre *et al.*, 2018; Marin, *et al.*, 2019).

Estos péptidos son importantes en organismos que carecen de sistema inmune basado en linfocitos, como es el caso de los alacranes, en lo que los PDH son esenciales en su defensa ante patógenos (Zhang *et al.*, 2021). Tal es el caso de la BmTXKS2, proveniente de *Buthus martensii*, la opiscorpina de *Opisththalmus carinatus* o la heteroscorpina-1 de *Heterometrus laoticus*. Algunos alacranes suelen contener más de un tipo de PAM en su veneno, como es el caso de las bactridinas (Bacts) presentes en el veneno de *Tityus discrepans*, estos son particulares por su tamaño, de 61 a 64 a. a., y porque contienen cuatro puentes disulfuro (Harrison *et al.*, 2014). Por otro lado, el *Tenebrio molitor* cuenta con las Tenecinas 1, 2 y 3, y su resistencia a infecciones es dependiente de la acción de los tres PDH en conjunto (Chae *et al.*, 2011). En este proyecto se analizó el efecto antibacteriano e inmunomodulador de los péptidos derivados del veneno de alacrán FA1 y Pin2[G] durante una infección gastrointestinal por *Salmonella Typhimurium*.

En los estudios *in vitro* se observó que FA1 decrece la viabilidad de células RAW264.7 y de BMDM, **Gráfica 1**. En células RAW264.7 esto ocurre a concentraciones altas (75 y 150 µg/mL) similar a lo reportado en la literatura (Rodríguez *et al.*, 2013), mientras que parece que los BMDM son más sensibles a este péptido, posiblemente esto se deba que la primera es una línea celular y la segunda se obtuvo directamente de ratones. Ya que, si bien se ha demostrado que las diferencias entre células RAW264.7 y los BMDM son mínimas, particularmente limitadas la expresión de ciertos receptores, como el CD14 más presente en RAW264.7 que en BMDM (Berghaus *et al.*, 2011), también se ha observado que ciertos péptidos antimicrobianos, actúan de

forma distinta sobre la viabilidad de dichas estirpes celulares. Por ejemplo, la incubación de BMDM con concentraciones crecientes de melitinina (0.2 – 5 µg/mL) disminuye abruptamente su viabilidad, mientras que en células RAW264.7 esto ocurre de forma gradual (Choe & Kim, 2017). Estas diferencias también fueron reportadas cuando se incubó a células RAW264.7 y a las células de epitelio bronquial 16HBEo⁻ y CFBE41o⁻ con el péptido SET-M33D, en donde se observó que el índice de citotoxicidad media más alto fue el de las células CFBE41o⁻ (2.9×10^{-5} M de péptido), mientras que las más sensibles fueron las células RAW264.7 (1.8×10^{-5} M de péptido) (Brunetti *et al.*, 2020). De igual forma, los péptidos LL-37, Bac2A e indolicina afectan más la viabilidad de células HBE que la de THP-1 (Bowdish *et al.*, 2005). Con esto podemos observar cómo los PAM afectarán de forma particular a cada estirpe celular.

El efecto citotóxico se complementa con los ensayos de concentración mínima inhibitoria contra *S. Typhimurium*, **Gráfica 2**, en los que el FA1 inhibe el crecimiento bacteriano a 18.5 µg/mL. Esto difiere de la MIC reportada por Arenas *et al.*, (2019), que calculó una MIC contra *S. Typhimurium* de 35 µg/mL con FA1, lo cual es el doble de los aquí reportado. Si bien la variación en resultados de ensayos de concentración mínima inhibitoria es común, ya que el efecto antimicrobiano depende de varios factores como concentración, susceptibilidad bacteriana y farmacodinamia (Wen *et al.*, 2016), aquí se observa una discrepancia que debe de ser revisada. También cabe mencionar que, previamente, se había observado que FA1 es activo, a concentraciones similares y en experimentos *in vitro*, contra bacterias Gram-negativas como *E. coli* (6.25 µg/mL) y *P. aeruginosa* (15 µg/mL) (Arenas *et al.*, 2016). Con esto se observa que FA1 es cuatro veces más tóxico contra bacterias que contra células eucariotas, lo que puede significar que su uso es viable en modelos que involucren a ambos tipos de células.

La relación entre la activación de elementos de la respuesta inmune y la resolución de la infección se estudió mediante ensayos de estimulación de la fagocitosis. Esta actividad se incrementó cuando se incubó a BMDM con 2.34 µg/mL de FA1, **Gráfica 3**, en células RAW264.7 esto ocurrió con 1.17 µg/mL de FA1. Dicho efecto parece decrecer cuando se usan 37.5 µg/mL de FA1, lo cual puede referir a un umbral de actividad, esto debe de verificarse con experimentos sobre la actividad de vías de señalización, que se activen en presencia del péptido. Hay que mencionar que estas concentraciones son en las que menos influencia se observa de los péptidos sobre la viabilidad celular, lo cual establece una relación entre la integridad celular y la

activación de la fagocitosis. Sin embargo, las concentraciones más interesantes fueron las de 75-150 $\mu\text{g/mL}$ ya que estas, incrementan la fagocitosis y el efecto bactericida de los macrófagos, **Gráfica 4**. Parece entonces que hay cierta relación entre las altas concentraciones de FA1 con la viabilidad de los macrófagos y su capacidad de fagocitar y eliminar bacterias.

Para continuar con estos estudios se incubó a células RAW264.7 con diferentes concentraciones de FA1 (18.75-150 $\mu\text{g/mL}$) y se determinó el perfil de expresión de citocinas. Aquí se observó que 37.5 $\mu\text{g/mL}$ de FA1 incrementan la expresión de la quimiocina MCP-1 y que 18.75 a 150 $\mu\text{g/mL}$ de este péptido incrementan la de TNF, **Gráfica 5**. Esto indica que se produce un perfil inflamatorio en los macrófagos al estimular la actividad quimiotáctica, con el incremento de MCP-1, y la actividad inflamatoria dependiente de NF- κ B mediante el aumento de la expresión de TNF. Lo cual podría estar asociado a lo reportado anteriormente, sobre que FA1 incrementa la expresión de TLR2 y NOD-2 (Información no publicada).

Por otro lado, cuando existe un estímulo con los péptidos y un posterior reto con *Salmonella Typhimurium*, **Gráfica 6**, se observa un incremento de IFN- γ , IL-6, IL-12p70 con 150, 75 y 37.5 $\mu\text{g/mL}$ de FA1, respectivamente, al mismo tiempo que decrece la expresión de MCP-1 y TNF a todas las concentraciones probadas (18.75-150 $\mu\text{g/mL}$). Resulta interesante que las mismas concentraciones que estimulan la producción de IFN- γ e IL-6 incrementan también la actividad fagocítica (150 $\mu\text{g/mL}$ y 75 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) y a su vez, son las concentraciones en las se observó efecto bactericida por los macrófagos. Además de que estas mismas concentraciones son las que inhiben el crecimiento bacteriano. Con lo que se podría hablar de que la incubación de células RAW con concentraciones superiores a 75 $\mu\text{g/mL}$ produce un perfil inflamatorio que conlleva a la erradicación de la bacteria. Sin embargo, también hay que resaltar que 75 y 150 $\mu\text{g/mL}$ de FA1 son las concentraciones que comprometen la viabilidad celular, lo cual podría explicarse por una activación de la apoptosis por la liberación de IL-6 y TNF. Posiblemente, usar concentraciones cercanas a 75 $\mu\text{g/mL}$ sea lo más indicado para futuros experimentos que busquen un equilibrio entre la viabilidad celular y la erradicación bacteriana.

Tomando en cuenta que se demostró mediante ensayos de fluorescencia que FA1 se interna en células bacterianas y asumiendo que dicho comportamiento se mantiene en macrófagos, se puede pensar que FA1 se adentra en ellos y actúa como ligando endógeno de TLR2, así como ocurre con otros PAM, como la HBD3, fragmentos hialuronano y proteínas de

choque térmico (Oliveira-Nascimento *et al.*, 2012). Luego, activa NF- κ B en una vía dependiente de MyD-88, con lo que promueve la expresión de las citocinas inflamatorias: IFN- γ , IL-6, IL-12p70 y con ello estimula la fagocitosis y el efecto bactericida, **Figura 3**.

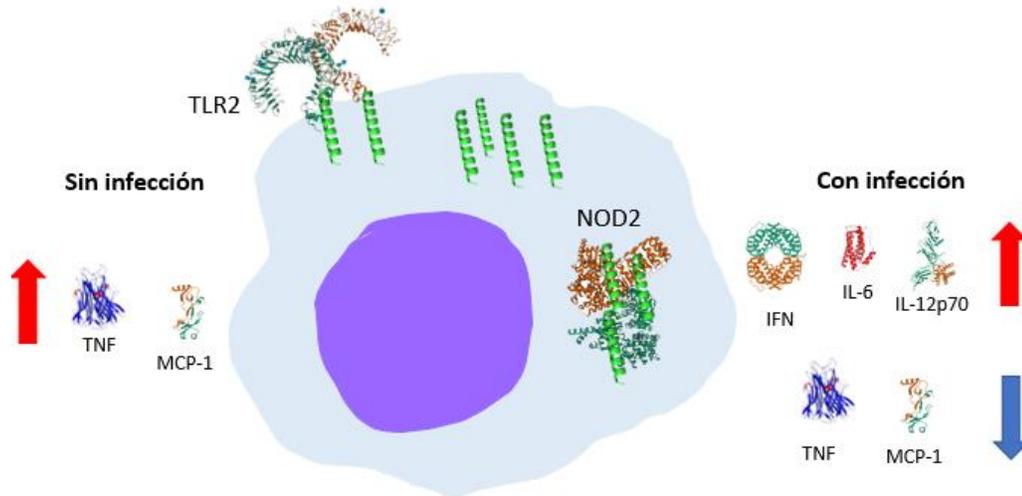


Figura 3. Posibles efectos de FA1 sobre macrófagos. Se muestra a manera de resumen el posible modelo que explique los efectos conocidos hasta el momento de FA1 sobre macrófagos. **α -hélice verde:** FA1; **Flecha azul:** decremento de expresión; **Flecha roja:** incremento de expresión.

Considerando los resultados *in vitro*, que refieren a un efecto antimicrobiano y estimulación de la respuesta inmunitaria por parte de FA1, se procedió a desarrollar un modelo de infección gastrointestinal con *S. Typhimurium*. De inicio, FA1 administrado vía intravenosa a 5 mg/kg no resuelve la infección de *Salmonella Typhimurium* en ratones infectados, ni impide que esta se propague a hígado, pero sí logra recuperar el peso de los ratones, **Gráfica 7**. Lo cual demuestra la clara diferencia entre los experimentos *in vitro*, en los que sí se inhibe el crecimiento bacteriano y el modelo *in vivo*. Algo similar a esto ocurrió cuando se probó el efecto de FA1 en modelos de infección tópica por *P. aeruginosa* en conejos, ya que *in vitro* FA1 sí inhibe el crecimiento de *Pseudomonas*, pero no así en el modelo *in vivo* (Arenas, 2020).

En el análisis de perfil de expresión de citocinas, **Gráfica 8**, se observó una disminución de IFN- γ y MCP-1, pero un incremento de IL-10, lo cual refiere a un ambiente antiinflamatorio en el que se decrece el reclutamiento de macrófagos y su actividad fagocítica. Esto podría explicar la falta de pérdida de peso en los ratones, pese a que la infección se mantiene y avanza. En esto FA1 muestra cierta similitud *in vitro* e *in vivo* ya que en ambos modelos merma la expresión de MCP-1 e IFN- γ , por lo que se podría proponer que cumple una función

antiinflamatoria mediante la inhibición de la quimiotaxis. Al mismo tiempo que promueve en ambos modelos la expresión de IL-10, **Figura 4**.

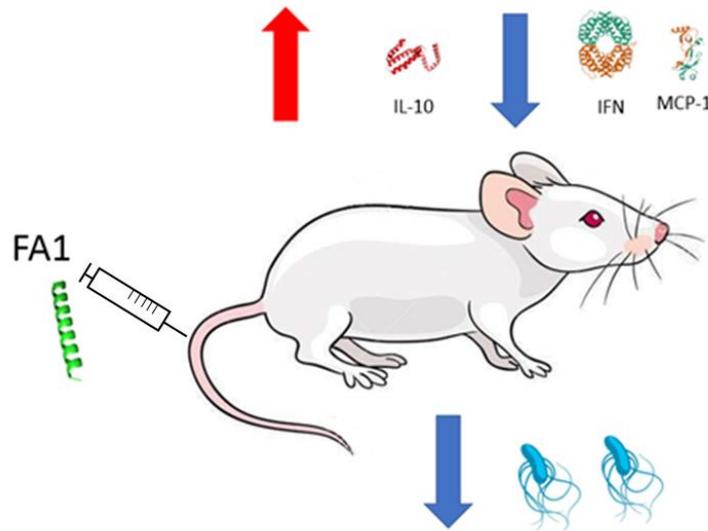


Figura 4. Efectos de FA1 sobre ratones. Se muestra a manera de resumen el posible modelo que explique los efectos conocidos hasta el momento de FA1 sobre los ratones infectados con *Salmonella Typhimurium*. **α-hélice verde:** FA1; **Flecha azul:** decremento de expresión; **Flecha roja:** incremento de expresión.

En cuanto al efecto de Pin2[G] sobre la viabilidad celular, **Gráfica 9**, se observó que el péptido decrece la población de células RAW264.7 (10 µg/mL); mientras que, en células BMDM se observa un mayor daño. Nuevamente, esto puede deberse a la diferencia entre ambas líneas celulares, semejante a lo observado con FA1. Por otro lado, se observó que Pin2[G] inhibe el crecimiento de *S. Typhimurium* a 75 µg/mL, **Gráfica 10**. Esto resulta interesante, dado que Arenas *et al.*, (2016) determinó que esta era de 150 µg/mL, 2 veces lo aquí reportado, nuevamente se pueden observar estas discrepancias entre experimentos. Se observa entonces que Pin2[G] es poco activo contra Gram-negativos, pues inhibe el crecimiento de *E. coli* a >50 µg/mL y el de *P. aeruginosa* a 60 µg/mL (Arenas *et al.*, 2016). Con esto se concluye que Pin2[G] afecta más a células eucariotas que a bacterianas, lo cual podría referir a que su función en el veneno de alacrán está más enfocada en dañar a su presa que a impedir la colonización bacteriana, como ha sugerido Harrison *et al.*, (2014) que ocurre con PAM derivados de veneno de alacrán.

En cuanto al efecto de Pin2[G] sobre la fagocitosis, se observó que 0.31 µg/mL del péptido activan este efecto en BMDM y 1.17 µg/mL hacen lo mismo en RAW264.7, **Gráfica 11**. Como ya se mencionó, estas concentraciones son las que menos influyen sobre la integridad

celular, lo cual parece ser una cualidad favorable para Pin2[G]. Sin embargo, la activación del efecto bactericida en células RAW264.7 ocurre a 10 µg/mL, **Gráfica 12**. Por lo tanto, parece que no hay correlación entre la activación de la fagocitosis y del efecto bactericida cuando las células son incubadas con Pin2[G]. Resulta interesante también el hecho de que el efecto bactericida (10 µg/mL) es notablemente inferior a la MIC de Pin2[G] contra *S. Typhimurium* (75 µg/mL). Lo cual podría referir a la activación de una vía de señalización y no a que el péptido se esté internalizando en las células y así inhiba el crecimiento bacteriano.

Por otro lado, Pin2[G] (10 µg/mL) incrementa los perfiles de expresión de MCP-1 y TNF en células RAW 264.7 sin infección previa, **Gráfica 13**. Mientras que en células infectadas con *S. Typhimurium*, **Gráfica 14**, la citocina que más se expresa es IL-12p70, la cual es importante en la erradicación de bacterias intracelulares, como es el caso de *Salmonella*. En esta misma condición hay un notable decremento de MCP-1 y TNF a todas las concentraciones probadas de Pin2[G]. Pareciera entonces que las células RAW264.7 incubadas con 10 µg/mL de Pin2[G] aumentan su potencial bactericida por un incremento de MCP-1 y TNF, previo a la infección, aunque después de ser infectadas la expresión de estas citocinas se reduce. También hay que considerar que Pin2[G] promueve la expresión de TLR2, TLR4 y NOD2. Por lo que es posible que haya una vía que conecte la expresión de estos receptores con la estimulación de la fagocitosis y con el efecto bactericida, pero dicha vía no puede ser observada con los experimentos aquí mencionados. Valdría entonces analizar la presencia de receptores como CD64 y CD32, asociados a la fagocitosis, la vía NF-κB dependiente de MyD88, relacionada con la activación de TLR2 y TLR4, además de la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, encargadas de inhibir el crecimiento de bacterias en citoplasma.

Si se asume que la distribución de Pin2[G] en células eucariotas es similar a la de procariontes, en las que el péptido se queda a nivel de membrana (Ibarra, 2017), se puede sugerir que a 10 µg/mL genera poros membranales e interactúa con receptores TLR2 y TLR4, posiblemente con la región extracelular de estos, con lo que activa NF-κB en una vía dependiente de MyD-88 y promueve la producción de TNF y MCP-1, con lo cual podría generar un ambiente inflamatorio reflejado en macrófagos con incremento en su actividad bactericida, **Figura 5**. Sin embargo, una vez ocurrida la infección, el decremento de la secreción de MCP-1 y de TNF disminuiría la quimiotaxis, pero incrementaría el efecto bactericida no asociado a IFN-γ y con

producción de IL-12p70, la cual se ha asociado a la actividad quimiotáctica independiente de MCP-1 (Ha *et al.*, 1999). Resulta de llamar la atención que una de las funciones de IL-12p70 es promover la producción de IFN- γ y con ello promover la fagocitosis y el efecto bactericida (Verma *et al.*, 2006). Es así como parece que Pin2[G] estimula la fagocitosis en respuesta a que también estimula la expresión de IL-12p70, para corroborar esto se puede determinar si existe un incremento de receptores CD64 o CD32, mientras que para corroborar que el efecto bactericida es debido a la activación celular, y no a que el péptido se adentra en el macrófago, se puede determinar la concentración de especies reactivas de oxígeno, de nitrógeno o cambios de pH.

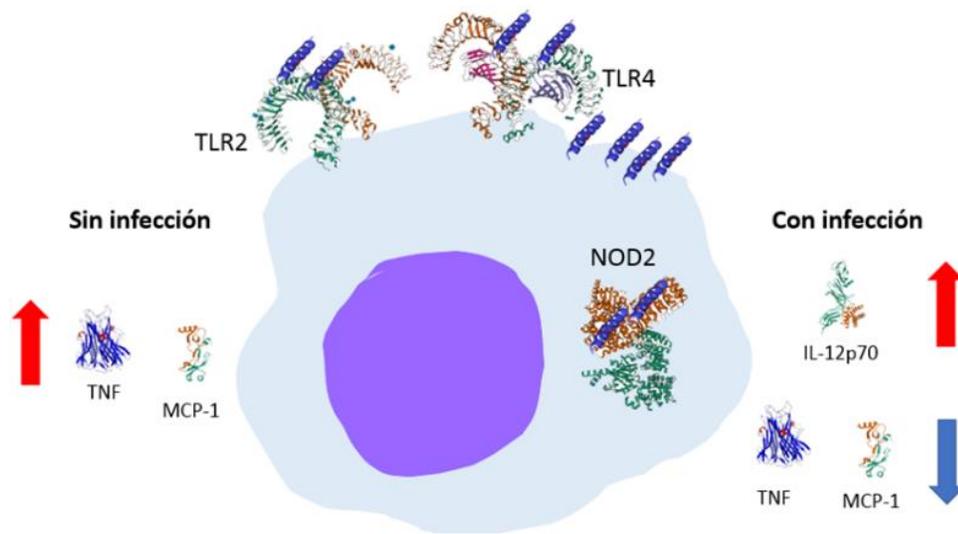


Figura 5. Posibles efectos de Pin2[G] sobre macrófagos. Se muestra a manera de resumen el posible modelo que explique los efectos conocidos hasta el momento de Pin2[G] sobre macrófagos. **α -hélice azul:** Pin2[G]; **Flecha azul:** decremento de expresión; **Flecha roja:** incremento de expresión.

A nivel *in vivo* en el modelo de infección gástrica por *Salmonella Typhimurium* y tratado con Pin2[G] (2.5 mg/kg) tampoco se logró resolver la infección; los ratones perdieron peso a lo largo del tratamiento y el conteo de bacterias en heces e hígado no disminuyó de forma significativa, **Gráfica 15**. Nuevamente observamos una diferencia entre lo reportado *in vitro*, donde sí se inhibió el crecimiento bacteriano, y los modelos *in vivo*. Hay que mencionar que en modelos de infección tópica por *P. aeruginosa* sí hubo coherencia entre la actividad antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* con Pin2[G] (Arenas *et al.*, 2020).

El perfil de expresión de citocinas reveló un incremento de IL-6 e IL-12p70, además de un decremento de IFN- γ , **Gráfica 16**. Esto es de llamar la atención, ya que la función de IL-12p70 es estimular la producción de IFN- γ , que es la citocina encargada de estimular la

fagocitosis y erradicación de patógenos intracelulares, la ausencia de esta puede explicar por qué el sistema inmune parece no actuar contra *Salmonella*. También es interesante que IL-6 se encuentre elevada, pues su efecto inflamatorio favorece la dispersión de *S. Typhimurium* por el organismo, **Figura 6**. Estas dos condicionantes, el ambiente inflamatorio y el decremento de la actividad bactericida, pueden ser la explicación de que la enfermedad progrese y se disperse por el organismo. En este caso, tanto *in vitro* como *in vivo* se incrementa la expresión de IL-12p70. Lo cual refiere a la importancia de esta citocina en la infección por *Salmonella*.

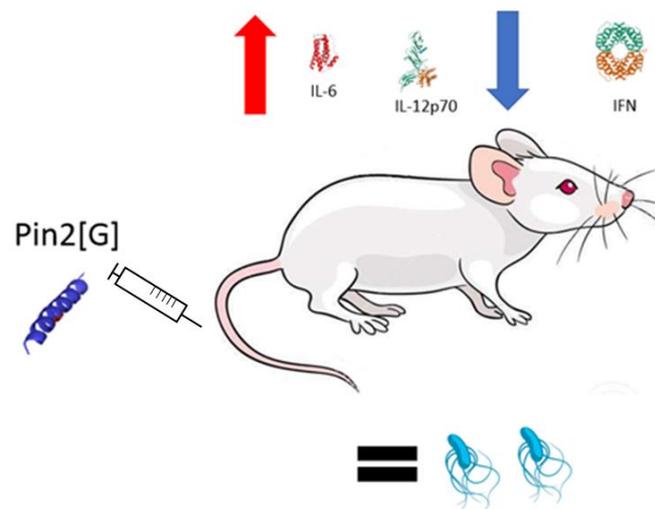


Figura 6. Efectos de Pin2[G] sobre ratones. Se muestra a manera de resumen el posible modelo que explique los efectos conocidos hasta el momento de Pin2[G] sobre los ratones infectados con *Salmonella Typhimurium*. **α-hélice roja:** Pin2[G]; **Flecha azul:** decremento de expresión; **Flecha roja:** incremento de expresión.

Otro aspecto para analizar es la capacidad de los péptidos para inhibir el crecimiento bacteriano cuando son usados en conjunto. Lo que se observó en estos experimentos fue que, si bien para inhibir el crecimiento de *S. Typhimurium*, **Tabla 5**, se requiere de menos concentración de FA1 y Pin2[G] cuando son usados en conjunto (9.25 y 37.5 µg/mL, respectivamente), no se puede hablar de un efecto sinérgico, sino de uno aditivo. Esto indica que cada péptido usa su propio mecanismo de acción para detener el crecimiento bacteriano. A diferencia de esto, la combinación de ambos péptidos no incrementa su toxicidad contra células RAW264.7, **Tabla 6**; sin embargo, este efecto antibacteriano y poco tóxico contra eucariotas *in vitro* no se refleja *in vivo*, pues en ratones con infección gastrointestinal por *Salmonella Typhimurium*, la infección no solo no decrece, sino que el ratón sufre de más daño, que cuando los péptidos son usados por

separado. Es así como se propone no usar combinaciones de péptidos, sino de péptidos con antibióticos, ya que se estima que en estas los PDH servirían como moléculas de entrada al interior celular más que como antimicrobianos (Harrison *et al.*, 2014).

La primera cualidad que se busca en los PAM o PDH es que cuenten con efecto antibacteriano. En este caso se buscó determinar si nuestros péptidos inhiben el crecimiento de *Salmonella Typhimurium*. Esto ya ha sido analizado en otros péptidos, como Bac5 (42 a. a. Carga +10), que es un péptido lineal rico en prolina, miembro de la familia de las catelicidinas que inhibe el crecimiento de *S. Typhimurium* LT2 y *S. Typhimurium* ATCC14028 a 50 µg/mL. Este péptido tiene un patrón repetido de Arg-Pro-Pro y su actividad está íntimamente relacionada con su región N-terminal (Yang *et al.*, 2020). De Bac5 se derivó un péptido con N-terminal truncado, el cual se denominó BSN-37 (37 a. a. Carga +5), este tiene una MIC de 8.33 µg/mL contra *S. Typhimurium* CMCC50097 (Yang *et al.*, 2020). También se ha estudiado al derivado de LL-37 denominado KR-12-a5 (12 a. a. Carga +6), que inhibe el crecimiento de *S. Typhimurium* KCTC1926 a una concentración de 5 µM la cual es menor que la de Pin2[G] (37.5 µg/mL≈14.6µM) y que la de FA1 (18.75 µg/mL≈6.23µM) (Kim *et al.*, 2017). Considerando las concentraciones mencionadas, se observa que Pin2[G] (24 a. a. Carga +3) y FA1 (28 a. a. Carga +7) inhiben el crecimiento de *Salmonella Typhimurium* a una concentración semejante a la de otros PDH, también resalta que su tamaño y carga son semejantes a las de otros péptidos. Con esto se puede observar la importancia de encontrar nuevos PDH y de diseñar derivados sintéticos de ellos. Tal como es el caso de Pin2[G], derivado de Pin2, y de FA1, derivado de la hadrurina y de la vejovina, teniendo en consideración su tamaño, carga y efecto antibacteriano. Sin embargo, también debe de considerarse que las bacterias, como todo ser vivo, responden a estímulos. Si bien se considera que hay una baja probabilidad de generar resistencia hacia PAM, hay que recordar que *S. Typhimurium* activa los genes *pmrH* y *pagP* ante la presencia de concentraciones subletales de antimicrobianos para modificar la integridad de su membrana externa y así ser menos susceptible al efecto de dichos péptidos (Richards *et al.*, 2012; Goto *et al.*, 2017).

Cuando se piensa en el efecto sobre elementos de la respuesta inmune de los PDH, resulta interesante que algunos péptidos parecen no ejercer un efecto dosis-dependiente. Por ejemplo, el péptido CSP32 estimula la capacidad de células RAW264.7 de fagocitar esferas marcadas con IgG-FITC cuando se incuban a las células con 17.6 y 88 µM de péptido (Ji *et al.*, 2020). De igual

forma, se ha observado que cuando se incuban células THP-1 con diferentes concentraciones de LL-37 se estimula la fagocitosis de *E. coli* y de *S. aureus* con 10 y 1 $\mu\text{g/mL}$ de péptido, respectivamente. Se puede observar que estos péptidos estimulan la fagocitosis a concentraciones puntuales. Así como ocurre con FA1 (1.17 y 150 $\mu\text{g/mL} \approx 0.38$ y 49.8 μM) y Pin2[G] (0.31 $\mu\text{g/mL} \approx 0.12\mu\text{M}$), con lo que se puede decir que existe una concentración muy específica a la que los péptidos muestran efectos particulares.

Si consideramos además la inhibición del crecimiento bacteriano una vez que las bacterias han sido fagocitadas podemos referir al péptido BSN-37, el cual disminuye la replicación de *S. Typhimurium* dentro de células de riñón canino Madin-Darby cuando se les incubaba con 400 $\mu\text{g/mL}$ de péptido. Este efecto no ha sido solo observado en PDH, sino que también en compuestos como la metergolina, que inhibe el crecimiento bacteriano en macrófagos RAW264.7 a $\sim 8 \mu\text{g/mL}$, pero en medio Mueller-Hinton lo hace a $>256 \mu\text{g/mL}$ (Ellis *et al.*, 2019). Esto último es importante, pues demuestra que incluso cuando se trata de modelos *in vitro* existen discrepancias según lo que sea que se está analizando. Ciertos antibióticos como la eritromicina, la piperacilina, la rifampicina y la novomiocina, tienen efectos dependientes de la concentración a la que actúen, ya que pueden inhibir el crecimiento de *S. Typhimurium* intracelular al permeabilizar la membrana externa de los macrófagos (Ellis *et al.*, 2019). Por otro lado, al igual que con Pin2[G] y su estimulación de un efecto inflamatorio y poco bactericida, existen péptidos que parecen promover el estado infeccioso. Tal es el caso de la defensina humana 5 (HD5), que promueve la adhesión e internalización de *Shigella flexneri* Sf301 en macrófagos derivados de monocitos humanos, linfoblastos humanos (U937), células THP-1 y RAW264.7 cuando se incubaba a estas células con 4 μM del péptido. Sin embargo, en el espacio intracelular *Shigella* procede a multiplicarse y produce muerte celular por necrosis (Xu *et al.*, 2019).

Este efecto sobre la fagocitosis se ha atribuido a que ciertos péptidos estimulan la presentación de antígenos al interactuar directamente con los receptores inmunitarios o al formar complejos con PAMPs como el LPS o el DNA, lo cual desencadena el efecto sinérgico en la activación de TLRs o NLRs (Wan *et al.*, 2014; Prasad *et al.*, 2019; Tuxpan *et al.*, 2022). De momento se desconoce si Pin2[G] o FA1 se unen a DNA o LPS, si bien sus características fisicoquímicas podrían aseverar que sí, es necesario determinar el grado de unión al cuál lo harían, si esta es reversible, si influye en la acción o producción de proteínas bacterianas y si esto

influye en su actividad inmunitaria. Lo que sí se sabe es que Pin2[G] promueve la expresión de TLR4, TLR2 y NLR-2 y que FA1 estimula la de TLR2 y NLR-2, los cuales son de suma importancia en el control de la infección por *Salmonella* (Das *et al.*, 2015).

El principal acercamiento que se ha hecho hacia la actividad inmunomoduladora de los PDH yace en el estudio de su influencia en los perfiles de expresión de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias. Por ejemplo, la granulicina inhibe la producción de IL-12 y de las quimiocinas MCP-1, IP-10 y MDC por monocitos durante la infección por *Propionibacterium acnes* (Lee *et al.*, 2019). La nisina estimula la producción de IL-1 β e IL-6 en células mononucleares de sangre periférica (PMBC) (Małaczewska *et al.*, 2018). Los péptidos de neutrófilos humanos 1-3 (HNP1-3) promueven la liberación de TNF- α e IFN- γ por macrófagos e incrementan la expresión de CD32 y CD64, lo que potencia la actividad fagocítica de dichas células hacia *S. aureus* (Soehnlein *et al.*, 2008). En la misma línea, las HBD2-4 estimulan la expresión de IL-6, IL-10, IP10, MCP-1, MIP-3 α y RANTES/CCL5. Un efecto similar se observa en la reducción de la expresión de IL-6, IL-8, TNF, IL-1 α e IL-1 β en células epiteliales infectadas con *S. Typhimurium*, pero tratadas con HBD2 o HBD3 (Fusco *et al.*, 2017). Por otro lado, la catelicidina LL37 estimula a mastocitos para producir IL-1 β , IL-6, TNF y quimiocinas como CCL2 y CCL3. LL37 también incrementa la expresión de MCP-1, IL-8, pero no de TNF lo cual lleva al reclutamiento de células inmunitarias al sitio de la infección (Lee *et al.*, 2019).

El mecanismo por el que los PDH actúan sobre los perfiles de expresión de citocinas se ha estudiado recientemente. Se ha visto que las HBD estimulan la quimiotaxis al interactuar con receptores de quimiocinas, como el CCR6 (Lee *et al.*, 2019). También se ha observado que la β -defensina porcina 2, de efecto bactericida, interfiere con la vía TLR4/NF- κ B e inhibe la liberación de las citocinas proinflamatorias: IL-6, TNF, IL-1 β e IL-12 (Zhang *et al.*, 2021). Por su parte, LL37 incrementa la presencia membranal de TLR2, TLR4 y TLR9, junto con la de TLR3, TLR5 y TLR7 en citoplasma, con lo que incrementa la capacidad de los mastocitos de detectar patógenos. LL37 también estimula la quimiotaxis al interactuar con el receptor tipo formil péptido 1 (FPRL1) (Lee *et al.*, 2019). En células mononucleares de sangre periférica (PMBC) se ha observado que LL-37 modula la transcripción de TNF e IFN- γ (Alexandre *et al.*, 2018). Además de que promueve la síntesis de receptores TLR4 y de IL-1 β en enterocitos infectados con *S. Typhimurium* (Marin *et al.*, 2019). Otro ejemplo es el del péptido KLK, que activa neutrófilos

y monocitos, al mismo tiempo que inhibe la liberación de IL-1 β y TNF por parte de macrófagos en presencia de LPS. Dicho efecto corresponde a la interacción del péptido con intermediarios de la vía de NF- κ B, sin alterar la viabilidad celular (Jantaruk *et al.*, 2017). Otros péptidos sí alteran la viabilidad y el tipo de muerte celular a la par que modulan la liberación de citocinas, por ejemplo, los péptidos KT2 y RT2 favorecen la apoptosis tardía de células RAW 264.7, al mismo tiempo que suprimen la producción de IL-1 β , TNF- α y IL-6, posiblemente porque inhiben la transcripción y traducción de JNK-1 (Payoungkiattikun *et al.*, 2020). Por otro lado, LL-37 y la catelicidina-WA mantienen la integridad epitelial de células de colon (T84) infectadas con *S. Typhimurium* al promover la reorganización de la zónula ocludens (ZO-1). Además de que previenen la invasión bacteriana en dichas células y estimulan la expresión de TLR4 y citocinas inflamatorias, como la IL-1 β ante el reto bacteriano (Marin *et al.*, 2019). Toda esta información sirve para entender el efecto particular de los PDH sobre diferentes estirpes celulares, aunque el efecto que tienen sobre organismos complejos solo puede ser estudiado en modelos *in vivo*.

Durante la infección por *S. Typhimurium* cada citocina lleva a cabo diferentes roles. Por ejemplo, se ha observado que TNF puede incrementar la capacidad de *Salmonella* para colonizar células epiteliales, además de que también provoca un incremento en la respuesta inflamatoria. Se teoriza que *S. Typhimurium* cuenta con mecanismos de señalización que le permiten cambiar sus proteínas efectoras tras censar la concentración ambiental de TNF (Ma *et al.*, 2010). Por su parte, MCP-1 favorece la supervivencia y protección de ratones infectados con *S. Typhimurium* y promueve su eliminación por parte de los macrófagos (Depaolo *et al.*, 2005). En cuanto a la IL-6, es importante mencionar que esta es una de las principales citocinas asociadas al proceso inflamatorio y que tiene un papel importante en la resolución de infecciones. Se ha observado que, en ratones BALB/c infectados vía intraperitoneal con *S. Typhimurium*, favorece la dispersión bacteriana, pero que a bajas concentraciones disminuye la colonización intestinal (Febriza *et al.*, 2020). Por otro lado, IFN- γ tiene propiedades antibacterianas contra patógenos intracelulares, ya que estimula a la fagocitosis y a la liberación de especies reactivas de oxígeno, además de que dirige a las células hacia la muerte celular programada, lo cual evita los procesos inflamatorios asociados a la necrosis (Ingram *et al.*, 2018). En cuanto a IL-12p70, se ha observado que suprime la generación de centros germinales encargados de la maduración de anticuerpos y la generación de células B de memoria, así como de células plasmáticas de vida larga, lo cual complica la erradicación de *Salmonella* (Elsner *et al.*, 2019). Un incremento en la

expresión de IL-10 suele favorecer el desarrollo de una infección sistémica, ya que promueve un ambiente antiinflamatorio que lleva a una respuesta inmune tolerogénica que impide la resolución de la infección y crea las condiciones necesarias para su diseminación sistémica (Salazar *et al.*, 2017). El efecto de IL12-p70 varía según el modelo y el tratamiento en que se aplique, ciertos reportes han hablado de su importancia en la erradicación de *S. Typhi* y *S. Typhimurium*, pero no ha sido estudiada en profundidad (Salermo *et al.*, 2009; Salazar *et al.*, 2017).

Por su parte, la respuesta inmune a *Salmonella* es un tema que sigue en debate. Como se ha mencionado, la primera defensa celular está dada por las células M y las placas de Peyer, seguidas por los macrófagos, los neutrófilos y las células dendríticas (Pham *et al.*, 2015). Se sabe que la respuesta inmune requerida para limitar la infección es la Th1, mientras que una respuesta Th17 sirve para regular y reparar al tejido infectado. Si embargo, la respuesta inmune a largo plazo, en la que participan los Linfocitos T CD4 y CD8, sigue sin ser bien comprendida. Se ha dado prioridad al entendimiento de la participación de los Linfocitos T CD4, ya que son particularmente importantes en la defensa ante reinfecciones por *Salmonella*. De estos, se ha observado que los linfocitos residentes de nódulos linfáticos mesentéricos son los que más participan en la respuesta inmune a largo plazo, principalmente los T CD4⁺ productores de IFN- γ asociados a hígado (Benoun *et al.*, 2018; Peres *et al.*, 2021). En ciertos modelos inflamatorios por *Salmonella* inactivada, se ha observado que la producción de LL-37 por los neutrófilos estimula la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ productores de IL-17A y de Th17 dependientes de TGF- β 1. Lo cual podría estimular la respuesta inmune a largo plazo (Minns *et al.*, 2021).

La activación de los linfocitos T CD4⁺ por las placas de Peyer y los nodos linfáticos mesentéricos, además del desarrollo de respuestas tipo Th1 y Th17, son esenciales para la resolución de la infección. Esto se sabe pues ratones deficientes de IFN- γ e IFN- γ R son incapaces de resolver la infección. Mientras que, la producción de las citocinas IL-17 e IL-22 en mucosa intestinal protege la barrera intestinal. Es así que la respuesta tipo Th1 es indispensable para la resolución de la infección y la tipo Th17 lo es para prevenir la diseminación intestinal de *Salmonella Typhimurium* (Griffin *et al.*, 2011; Pham *et al.*, 2015; Benoun *et al.*, 2018).

En lo que concierne al uso *in vivo* de los péptidos, hay que resaltar que muy pocos han sido autorizados para su aplicación clínica dada su actividad hemolítica, citotoxicidad, degradación por proteasas, baja hidrosolubilidad, y problemas de biodistribución en suero (Boto

et al., 2018; Tawfik *et al.*, 2021). Sumado a esto, la introducción al mercado de estos compuestos se ve limitada por su relación costo-beneficio, la cual no es más efectiva que la de ciertos antibióticos, por lo que se les suele emplear como tratamientos de última elección y de aplicación específica (Boto *et al.*, 2018). Por esto se ha optado por buscar péptidos que ayuden a resolver procesos infecciosos estimulando la respuesta inmune aun si tienen un reducido efecto antimicrobiano (Mookherjee *et al.*, 2020).

Diversos grupos tratan de asociar los resultados de los estudios *in vitro* y los *in vivo*, para así entender la relación entre el efecto antimicrobiano e inmunomodulador de los PDH. Por ejemplo, el péptido sintético Pep19-2.5 inhibe, *in vitro*, el crecimiento de *S. Typhimurium*, sin embargo, su efecto antimicrobiano desaparece cuando se le administra vía oral a ratones con infección gástrica por dicha bacteria. También se observó que reguló la respuesta inmunitaria al reducir los niveles de transcripción de TNF y CCL2, así como la microbiota intestinal al disminuir el nivel de Lactobacilos y Clostridios. Por otro lado, se ha observado que cuando Pep19-25 se administra en conjunto con ibuprofeno, protege a ratones con sepsis por endotoxemia. Esta protección se correlaciona con una reducción de TNF y prostaglandina E en plasma, lo cual es consecuencia de la inhibición de las vías de TLR4 y COX (Dupont *et al.*, 2015; Heinbockel *et al.*, 2015; Heinbockel *et al.*, 2018). De igual forma, la cecropina AD protege a cerdos destetados de infección intestinal por *Escherichia coli* al mejorar su respuesta inmune. Este péptido resulta interesante, pues mantiene dicho efecto a diferentes condiciones *in vitro* y en presencia de diversos niveles de pH, temperatura, tiempo e incluso cuando es tratado con pepsina y tripsina. Estos estudios de estabilidad también han sido estudiados en FA1 y Pin2[G], al menos determinando su grado de estabilidad en plasma y en medio de cultivo, dado esto se ha determinado que ambos péptidos son estables durante 24 horas en medios *in vitro* (Arenas *et al.*, 2016). Volviendo con la cecropina AD, se ha observado que a nivel intestinal estimula el crecimiento de Lactobacilos, con lo que favorece la producción de inmunoglobulina A, lo cual explicaría el efecto inmunitario hacia enterobacterias (Wu *et al.*, 2012). De igual forma, el péptido ToAP2, proveniente del alacrán *Tityus obscurus*, promueve la quimiotaxis de macrófagos peritoneales en ratones C57BL/6 infectados con *Mycobacterium massiliense* (Marques-Neto *et al.*, 2018). Por otro lado, Shang (2019) caracterizó la inhibición de las citocinas TNF e IL-6 en murinos infectados con *Staphylococcus epidermidis* multirresistente (MRSE-1208) tras ser tratados con el péptido I1WL5W y penicilina. Este tipo de combinaciones resultan interesantes

cuando se considera que ciertos antibióticos convencionales promueven la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias (Frieling *et al.*, 1997; Calbo *et al.*, 2008; Olachi *et al.*, 2016).

Como se puede observar, hay múltiples factores que no son considerados en los ensayos *in vitro*, tales como diferencias de pH, concentraciones de sales, estrés nutricional, osmótico o el sinergismo de péptidos antimicrobianos con otros componentes del sistema inmune, lo cual resalta la importancia de no tomar a los experimentos *in vitro* como una base fiel que se reflejará *in vivo* (Lazzaro *et al.*, 2020). También se observó que para resolver la infección y prevenir que la sepsis desencadene daño a nivel de órganos, debe de existir una constante comunicación entre moléculas pro- y antiinflamatorias. Si bien el estudio de la sepsis se enfoca principalmente en las características del patógeno, las características inmunitarias del huésped también cumplen un papel importante en la patogénesis de la sepsis, pues el incremento de la respuesta inflamatoria puede desencadenar daño a nivel de órganos, mientras que un exceso de moléculas antiinflamatorias puede generar susceptibilidad a otras infecciones (Angus *et al.*, 2013).

Con esto se ha podido observar la complejidad de relaciones que establecen los péptidos antimicrobianos o de defensa cuando son usados en diferentes contextos y modelos. Nuestros péptidos, Pin2[G] y FA1, muestran características antimicrobianas e inmunomoduladoras a nivel *in vitro* que deberían de influir en la recuperación de la infección gastrointestinal por *Salmonella* Typhimurium. Si bien, en el modelo *in vivo* no se logra resolver la infección, no se puede negar la capacidad de ambos péptidos para estimular perfiles de expresión de citocinas particulares que podrían favorecer la resolución de esta u otras infecciones. Posiblemente un cambio en su dosificación, modelos de infección, su uso combinado con antibióticos convencionales o incluso una modificación en su estructura, nos permitirá encontrar un modelo en el que sean funcionales y sean parte de la lista de péptidos antimicrobianos usados en la terapéutica.

11. Conclusiones

- La viabilidad de los macrófagos RAW264.7 y BMDM se ve afectada por diferentes concentraciones de Pin2[G] y FA1.
- Parece existir una relación entre la concentración de Pin2[G] y FA1 y la activación de la fagocitosis en células RAW264.7 y BMDM.
- Ciertas concentraciones de Pin2[G] y FA1 incrementan la expresión de MCP-1 y TNF en células RAW264.7 no infectadas.
- En células RAW264.7 infectadas con *S. Typhimurium*, Pin2[G] estimula la liberación de IL-12p70 y decrece la de MCP-1 y TNF, mientras que FA1 incrementa la expresión de IFN- γ , IL-6, IL-12p70 y decrece la de MCP-1 y TNF.
- Pin2[G] y FA1 administrados vía intravenosa, no contrarrestan la infección por *S. Typhimurium* a nivel intestinal ni previenen su propagación a hígado.
- En modelos de infección *in vivo*, FA1 parece inducir un ambiente antiinflamatorio y Pin2[G] uno inflamatorio.

12. Perspectivas

- Estudiar el efecto de los péptidos sobre diferentes estirpes celulares leucocitarias, intestinales y hepáticas
- Usar métodos *in silico* para diseñar nuevos péptidos derivados de Pin2[G] y FA1 que mejoren sus cualidades.
- Determinar los mecanismos de acción por los cuales los péptidos influyen en la respuesta inmune a nivel de receptores o vías de señalización.
- Estudiar el efecto de los péptidos sobre los perfiles de citocinas asociados a la respuesta celular contra *S. Typhimurium*.
- Determinar el efecto de la combinación de péptidos con antibióticos.
- Desarrollar modelos de infección con cepas clínicas.
- Analizar la farmacocinética y farmacodinamia *in vitro* e *in vivo* de los péptidos.

13. Bibliografía

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular* (8th ed.). El Sevier Saunders.
2. Alexandre-Ramos, D. S., Silva-Carvalho, A. É., Lacerda, M. G., Serejo, T. R. T., Franco, O. L., Pereira, R. W., ... Saldanha-Araujo, F. (2018). LL-37 treatment on human peripheral blood mononuclear cells modulates immune response and promotes regulatory T-cells generation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, 1584–1590.
3. Angus, D. C., & Van der Poll, T. (2013). Severe Sepsis and Septic Shock. *The New England Journal of Medicine*, 369(9), 840–851.
4. Arenas, I., Villegas, E., Walls, O., Barrios, H., Rodríguez, R., & Corzo, G. (2016). Antimicrobial Activity and Stability of Short and Long Based Arachnid Synthetic Peptides in the Presence of Commercial Antibiotics. <http://doi.org/10.3390/molecules21020225>
5. Bacalum, M., & Radu, M. (2015). Cationic Antimicrobial Peptides Cytotoxicity on Mammalian Cells: An Analysis Using Therapeutic Index Integrative Concept. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 21(1), 47–55. <https://doi.org/10.1007/s10989-014-9430-z>
6. Berghaus LJ, Moore JN, Hurley DJ, Vandenplas ML, Fortes BP, Wolfert MA, Boons GJ. (2010). Innate immune responses of primary murine macrophage-lineage cells and RAW 264.7 cells to ligands of Toll-like receptors 2, 3, and 4. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 33(5):443-54. doi: 10.1016/j.cimid.2009.07.001. Epub 2009 Sep 3. PMID: 19732955; PMCID: PMC2888975.
7. Benfield AH, Henriques ST. Mode-of-Action of Antimicrobial Peptides: Membrane Disruption vs. Intracellular Mechanisms. *Front Med Technol*. 2020 Dec 11;2:610997. doi: 10.3389/fmedt.2020.610997. PMID: 35047892; PMCID: PMC8757789.
8. Benoun, J. M., Peres, N. G., Wang, N., Pham, O. H., Rudisill, V. L., Fogassy, Z. N., McSorley, S. J. (2018). Optimal protection against Salmonella infection requires noncirculating memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(41), 10416–10421. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808339115>
9. Blyth GAD, Connors L, Fodor C, Cobo ER. The Network of Colonic Host Defense Peptides as an Innate Immune Defense Against Enteropathogenic Bacteria. *Front Immunol*. 2020 May 20;11:965. doi: 10.3389/fimmu.2020.00965. PMID: 32508838; PMCID: PMC7251035.
10. Bobone S, Roversi D, Giordano L, De Zotti M, Formaggio F, Toniolo C, Park Y, Stella L. The lipid dependence of antimicrobial peptide activity is an unreliable experimental test for different pore models. *Biochemistry*. 2012 Dec 21;51(51):10124-6. doi: 10.1021/bi3015086. Epub 2012 Dec 13. PMID: 23228161.
11. Borish, L. C., & Steinke, J. W. (2003). Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*, 111(2), S460–S475.
12. Boto, A., De La Lastra, J. M. P., & González, C. C. (2018). The road from host-defense peptides to a new generation of antimicrobial drugs. *Molecules*, 23(2). <http://doi.org/10.3390/molecules23020311>.
13. Bowdish, D., Davidson, D. J., Scott, M. G., & Hancock, R. E. W. (2005). Immunomodulatory Activities of Small Host Defense Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 1727–1732. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1727-1732.2005>

14. Broz, P., Ohlson, M. B., & Monack, D. M. (2012). Innate immune response to *Salmonella* Typhimurium, a model enteropathogen. *Gut Microbes*, 3(2), 62–70.
15. Brunetti J, Carnicelli V, Ponzi A, Di Giulio A, Lizzi AR, Cristiano L, Cresti L, Cappello G, Pollini S, Mosconi L, Rossolini GM, Bracci L, Falciani C, Pini A. (2020). Antibacterial and Anti-Inflammatory Activity of an Antimicrobial Peptide Synthesized with D Amino Acids. *Antibiotics* (Basel). 24;9(12):840. doi: 10.3390/antibiotics9120840. PMID: 33255172; PMCID: PMC7760307.
16. Calbo, E., Alsina, M., Rodríguez-Carballeira, M., Lite, J., & Garau, J. (2008). Systemic expression of cytokine production in patients with severe pneumococcal pneumonia: effects of treatment with a beta-lactam versus a fluoroquinolone. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(7), 2395–2402. doi:10.1128/AAC.00658-07
17. Capparelli, R., Chiara, F. De, Nocerino, N., Montella, R. C., Iannaccone, M., Fulgione, A., ... Capuano, F. (2012). New perspectives for natural antimicrobial peptides: application as antiinflammatory drugs in a murine model.
18. Chae JH, Kurokawa K, So YI, Hwang HO, Kim MS, Park JW, Jo YH, Lee YS, Lee BL. Purification and characterization of tenecin 4, a new anti-Gram-negative bacterial peptide, from the beetle *Tenebrio molitor*. *Dev Comp Immunol*. 2012 Mar;36(3):540-6. doi: 10.1016/j.dci.2011.09.010. Epub 2011 Oct 5. PMID: 22001126.
19. Choe, J., & Kim, S. (2017). Melittin inhibits osteoclast formation through the downregulation of the RANKL-RANK signaling pathway and the inhibition of interleukin-1 β in murine macrophages. *International Journal of Molecular Medicine*, 39, 539-548. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2876>
20. Corrales-García, L., Ortiz, E., Castañeda-delgado, J., Rivas-Santiago, B., & Corzo, G. (2013). Bacterial expression and antibiotic activities of recombinant variants of human δ -defensins on pathogenic bacteria and *M. tuberculosis*. *Protein Expression and Purification*, 89(1), 33–43. <http://doi.org/10.1016/j.pep.2013.02.007>
21. Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K. J., He, W., Norton, R. S., & Nakajima, T. (2001). Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*, 45, 35–45.
22. Das, S., Sarkar, A., Choudhury, S. S., Owen, K. A., Derr-Castillo, V. L., Fox, S., ... Ernst, P. B. (2015). Engulfment and Cell Motility Protein 1 (ELMO1) Has an Essential Role in the Internalization of Salmonella Typhimurium Into Enteric Macrophages That Impact Disease Outcome. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 1(3), 311–324.
23. Dassanayake, R.P., Atkinson, B.M., Mullis, A.S. *et al*. Bovine NK-lysin peptides exert potent antimicrobial activity against multidrug-resistant *Salmonella* outbreak isolates. *Sci Rep* **11**, 19276 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98860-6>
24. Davidson, D. J., Currie, A. J., Reid, G. S. D., Bowdish, D. M. E., MacDonald, K. L., Ma, R. C., ... Speert, D. P. (2004). The Cationic Antimicrobial Peptide LL-37 Modulates Dendritic Cell Differentiation and Dendritic Cell-Induced T Cell Polarization. *The Journal of Immunology*, 172(2), 1146 LP – 1156. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.1146>

25. Depaolo RW, Lathan R, Rollins BJ, Karpus WJ. (2005). The chemokine CCL2 is required for control of murine gastric *Salmonella enterica* infection. *Infect Immun.*;73(10):6514-22. doi: 10.1128/IAI.73.10.6514-6522.2005. PMID: 16177325; PMCID: PMC1230974.
26. Dupont, A., Kaconis, Y., Yang, I., Albers, T., Woltemate, S., Heinbockel, L., ... Hornef, M. W. (2015). Intestinal mucus affinity and biological activity of an orally administered antibacterial and anti-inflammatory peptide. *Gut*, 64(2), 222 LP – 232. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307150>
27. Ellis, M.J., Tsai, C.N., Johnson, J.W. *et al.* A macrophage-based screen identifies antibacterial compounds selective for intracellular *Salmonella* Typhimurium. *Nat Commun* **10**, 197 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08190-x>
28. Elsner, R. A., & Shlomchik, M. J. (2019). IL-12 Blocks Tfh Cell Differentiation during *Salmonella* Infection, thereby Contributing to Germinal Center Suppression. *Cell Reports*, 29(9), 2796-2809.e5.
29. El-Zayat, S. R., Sibaii, H., & Mannaa, F. A. (2019). Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 187. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2>
30. Febriza, A., Natzir, R., Hatta, M., As'ad, S., Budu, Kaelan, C., ... Idrus, H. H. (2020). The Role of IL-6, TNF- α , and VDR in Inhibiting the Growth of *Salmonella* Typhi: *in vivo* Study. *The Open Microbiology Journal*, 14(1), 65–71. <https://doi.org/10.2174/1874285802014010065>
31. Frieling, J. T., Mulder, J. A., Hendriks, T., Curfs, J. H., van der Linden, C. J., & Sauerwein, R. W. (1997). Differential induction of pro- and anti-inflammatory cytokines in whole blood by bacteria: effects of antibiotic treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(7), 1439 LP – 1443. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.7.1439>
32. Fusco, A., Savio, V., Cammarota, M., Alfano, A., Schiraldi, C., & Donnarumma, G. (2017). Beta-Defensin-2 and Beta-Defensin-3 Reduce Intestinal Damage Caused by *Salmonella* Typhimurium Modulating the Expression of Cytokines and Enhancing the Probiotic Activity of *Enterococcus faecium*. *Journal of Immunology Research*, 2017, 6976935. <https://doi.org/10.1155/2017/6976935>
33. Giamarellou-Bourboulis E.J. & Raftogiannis M. (2012). The immune response to severe bacterial infections: consequences for therapy, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 10:3, 369-380
34. Goto, R., Miki, T., Nakamura, N., Fujimoto, M., & Okada, N. (2017). *Salmonella* Typhimurium PagP- and UgtL-dependent resistance to antimicrobial peptides contributes to the gut colonization. *PLOS ONE*, 12(12), e0190095. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190095>.
35. Griffin, A., McSorley, S. Development of protective immunity to *Salmonella*, a mucosal pathogen with a systemic agenda. *Mucosal Immunol* 4, 371–382 (2011). <https://doi.org/10.1038/mi.2011.2>
36. Guo L, Lim KB, Poduje CM, Daniel M, Gunn JS, Hackett M, et al. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell*. (1998) 95:189–98. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81750-x
37. Hancock R., Haney E. & Gill E. (2016). The immunology of host defense peptides: beyond antimicrobial activity. *Nature Rev Imm.* 16: 321 – 334.

38. Hancock R., Nijnik A. & Philpott D. (2012). Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nature Rev.* 10: 243 – 254.
39. Harrison, P. L., Abdel-Rahman, M. A., Miller, K., & Strong, P. N. (2014). Antimicrobial peptides from scorpion venoms. *Toxicon*, 88, 115–137.
40. Hayouja, Z., Bella, A., Stern, T., Ray, S., Jiang, H., Grovenor, C., & Ryadnov, M. (2017). Binary Encoding of Random Peptide Sequences for Selective and Differential Antimicrobial Mechanisms. *Angew Chem Int Ed Engl*, 56(28), 8099–8103.
41. Heinbockel L, Marwitz S, Barcena Varela S, Ferrer-Espada R, Reiling N, Goldmann T, Gutschmann T, Mier W, Schürholz T, Drömann D, Brandenburg K, Martinez de Tejada G. (2015). Therapeutical Administration of Peptide Pep19-2.5 and Ibuprofen Reduces Inflammation and Prevents Lethal Sepsis. *PLoS One*. 21;10(7):e0133291. doi: 10.1371/journal.pone.0133291. PMID: 26197109; PMCID: PMC4510266.
42. Heinbockel, L., Weindl, G., Martinez-de-Tejada, G., Correa, W., Sanchez-Gomez, S., Bárcena-Varela, S., ... Brandenburg, K. (2018). Inhibition of Lipopolysaccharide- and Lipoprotein-Induced Inflammation by Antitoxin Peptide Pep19-2.5. *Frontiers in Immunology*, 9, 1704. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01704>
43. Hilchie, A., Wuerth, K. & Hancock, R. (2013). Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nature chemical biology*. 9: 761-768.
44. Ibarra Valencia, M. A. (2017). Acción de péptidos antimicrobianos en infecciones tópicas en animales modelo. Universidad Nacional Autónoma de México.
45. Ingram, J. P., Brodsky, I. E., & Balachandran, S. (2017). Interferon- γ in *Salmonella* pathogenesis: New tricks for an old dog. *Cytokine*, 98, 27–32.
46. Jantaruk, P., Roytrakul, S., Sitthisak, S., & Kunthalert, D. (2017). Potential role of an antimicrobial peptide, KLK in inhibiting lipopolysaccharide-induced macrophage inflammation. *PLOS ONE*, 12(8), e0183852. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183852>
47. Ji SY, Lee H, Hwangbo H, Hong SH, Cha HJ, Park C, Kim DH, Kim GY, Kim S, Kim HS, Yoo JC, Choi YH. (2020). A Novel Peptide Oligomer of Bacitracin Induces M1 Macrophage Polarization by Facilitating Ca²⁺ Influx. *Nutrients*. 29;12(6):1603. doi: 10.3390/nu12061603. PMID: 32486100; PMCID: PMC7352993.
48. Jung K, Eyerly B, Annamalai T, Lu Z, Saif LJ. Structural alteration of tight and adherens junctions in villous and crypt epithelium of the small and large intestine of conventional nursing piglets infected with porcine epidemic diarrhea virus. *Vet Microbiol.* (2015) 177:373–8. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.03.022
49. Kim EY, Rajasekaran G, Shin SY. 2017. LL-37-derived short antimicrobial peptide KR-12-a5 and its d-amino acid substituted analogs with cell selectivity, anti-biofilm activity, synergistic effect with conventional antibiotics, and anti-inflammatory activity. *Eur J Med Chem.* 18;136:428-441. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.05.028. Epub 2017 May 11. PMID: 28525841.
50. Kubelkova, K., & Macela, A. (2019). Innate Immune Recognition: An Issue More Complex Than Expected. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00241>
51. Lazzaro BP, Zasloff M, Rolff J. (2020). Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. *Science*. 1;368(6490):eaau5480. doi: 10.1126/science.aau5480. PMID: 32355003; PMCID: PMC8097767.

52. Lee EY, Lee MW, Wong GCL. (2020). Modulation of toll-like receptor signaling by antimicrobial peptides. *Semin Cell Dev Biol*;88:173-184. doi: 10.1016/j.semcd.2018.02.002. Epub 2018 Feb 12. PMID: 29432957; PMCID: PMC6087683.
53. Lee EY, Takahashi T, Curk T, Dobnikar J, Gallo RL, Wong GCL. (2017). Crystallinity of Double-Stranded RNA-Antimicrobial Peptide Complexes Modulates Toll-Like Receptor 3-Mediated Inflammation. *ACS Nano*; doi: 10.1021/acsnano.7b05234
54. Ma, J., Zhang, Yg., Xia, Y. *et al.* The inflammatory cytokine tumor necrosis factor modulates the expression of *Salmonella* Typhimurium effector proteins. *J Inflamm* **7**, 42 (2010).
55. Mansour, S., Pena, O. & Hancock, R. (2014). Host defense peptides: front-line immunomodulators. *Trends in Imm.* 35 (9): 443 – 450.
56. Marin M, Holani R, Blyth GAD, Drouin D, Odeón A, Cobo ER. Human cathelicidin improves colonic epithelial defenses against *Salmonella* Typhimurium by modulating bacterial invasion, TLR4 and pro-inflammatory cytokines. *Cell Tissue Res.* (2019) 376:433–42. doi: 10.1007/s00441-018-02984-7
57. Marques-Neto, L. M., Trentini, M. M., das Neves, R. C., Resende, D. P., Procopio, V. O., da Costa, A. C., ... Junqueira-Kipnis, A. P. (2018). Antimicrobial and Chemotactic Activity of Scorpion-Derived Peptide, ToAP2, against *Mycobacterium massiliensis*. *Toxins*, 10(6), 219. <https://doi.org/10.3390/toxins10060219>
58. Marr A., Gooderham W. And Hancock R. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr. Op. Pharm.* 6(5):468-472
59. Medzhitov R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 1:135-45; PMID:11905821;<http://dx.doi.org/10.1038/35100529>
60. Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435. <http://doi.org/10.1038/nature07201>.
61. Minns, D., Smith, K.J., Alessandrini, V. *et al.* (2021). The neutrophil antimicrobial peptide cathelicidin promotes Th17 differentiation. *Nat Commun* **12**, 1285. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21533-5>
62. Mookherjee, N., Anderson, M. A., Haagsman, H. P., & Davidson, D. J. (2020). Antimicrobial host defense peptides: functions and clinical potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(5), 311–332.
63. Nijnik A. & Hancock R. (2009). Host defense peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tracking antibiotic-resistant infections. *Emerg Health Threats J.* 2(e1). doi:
64. Nomura, K., Ferrat, G., Nakajima, T., Darbon, H., Iwashita, T., Corzo, G., 2005. Induction of morphological changes in model lipid membranes and the mechanism of membrane disruption by a large scorpion-derived pore-forming peptide. *Biophys. J.* 89, 4067e4080
65. Noster J, Chao T-C, Sander N, Schulte M, Reuter T, Hansmeier N, et al. (2019) Proteomics of intracellular *Salmonella enterica* reveals roles of *Salmonella* pathogenicity island 2 in metabolism and antioxidant defense. *PLoS Pathog* 15(4): e1007741.
66. Olachi Anuforum, Graham R. Wallace, Michelle M. C. Buckner, Laura J. V. Piddock, Ciprofloxacin and ceftriaxone alter cytokine responses, but not Toll-like receptors, to *Salmonella* infection *in vitro*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 71, Issue 7, July 2016, Pages 1826–1833,

67. Organization WHO. (2014). In World Health Organization (Ed.), *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*.
68. Panda, S., & Ding, J. L. (2015). Natural Antibodies Bridge Innate and Adaptive Immunity. *J Immunol*, 194, 13–20.
69. Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B.-S., Lee, H., & Lee, J.-O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. *Nature*, 458(7242), 1191–1195. <https://doi.org/10.1038/nature07830>
70. Payoungkiattikun, W., Joompang, A., Thongchot, S., Nowichai, B., Jangpromma, N., & Klaynongsruang, S. (2020). Evidence of multi-functional peptide activity: potential role of KT2 and RT2 for anti-inflammatory, anti-oxidative stress, and anti-apoptosis properties. *Applied Biological Chemistry*, 63(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13765-019-0488-3>.
71. Peres NG, Wang N, Whitney P, Engel S, Shreenivas MM, Comerford I, et al. (2021) CD4+ T cell immunity to *Salmonella* is transient in the circulation. *PLoS Pathog* 17(10): e1010004. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010004>
72. Pham OH, McSorley SJ. (2015). Protective host immune responses to *Salmonella* infection. *Future Microbiol*;10(1):101-10. doi: 10.2217/fmb.14.98. PMID: 25598340; PMCID: PMC4323267.
73. Rathinam, V. A. K., Zhao, Y., & Shao, F. (2019). Innate immunity to intracellular LPS. *Nature Immunology*, 20(5), 527–533. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0368-3>
74. Redfern, R. L., Reins, R. Y., & McDermott, A. M. (2011). Toll-like receptor activation modulates antimicrobial peptide expression by ocular surface cells. *Experimental Eye Research*, 92(3), 209–220. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.exer.2010.12.005>
75. Richards, S., Strandberg, K., Conroy, M., & Gunn, J. (2012). Cationic antimicrobial peptides serve as activation signals for the *Salmonella* Typhimurium PhoPQ and PmrAB regulons in vitro and in vivo. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 102. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00102>
76. Rodríguez, A., Villegas, E., Montoya-rosales, A., Rivas-santiago, B., & Corzo, G. (2014). Characterization of Antibacterial and Hemolytic Activity of Synthetic Pandinin 2 Variants and Their Inhibition against *Mycobacterium tuberculosis*, 9(7). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0101742>
77. Salazar, G. A., Peñaloza, H. F., Pardo-Roa, C., Schultz, B. M., Muñoz-Durango, N., Gómez, R. S., Salazar, F. J., Pizarro, D. P., Riedel, C. A., González, P. A., Alvarez-Lobos, M., Kalergis, A. M., & Bueno, S. M. (2017). Interleukin-10 Production by T and B Cells Is a Key Factor to Promote Systemic *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infection in Mice. *Frontiers in immunology*, 8, 889.
78. Sánchez-Vásquez, L., Silva-Sánchez, J., Jiménez-Vargas, J. M., Rodríguez-Romero, A., Muñoz-Garay, C., Rodríguez, M. C. Possani, L. D. (2013). Biochimica et Biophysica Acta Enhanced antimicrobial activity of novel synthetic peptides derived from vejovine and hadrurin. *BBA General Subjects*, 1830(6), 3427–3436. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.01.028>.
79. Scott MG, Vreugdenhil AC, Buurman WA, Hancock RE, Gold MR. (2000). Cutting edge: cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein. *J Immunol*. 15;164(2):549-53. doi: 10.4049/jimmunol.164.2.549. PMID: 10623792.

80. Scott, M.G. et al. (2007) An anti-infective peptide that selectively modulates the innate immune response. *Nat. Biotechnol.* 25, 465–472
81. Seo M., Won H., Kim J., Mishig-Ochir T. and Lee BJ. (2012). Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review. *Molecules.* 17. 12276-12286.
82. Shang, D., Liu, Y., Jiang, F., Ji, F., Wang, H., & Han, X. (2019). Synergistic Antibacterial Activity of Designed Trp-Containing Antibacterial Peptides in Combination with Antibiotics Against Multidrug-Resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2719. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02719>
83. Shao, J.; Zhang, R.; Ge, X.; Yang, B.; Zhang, J. (2007). Analgesic Peptides in *Buthus Martensii* Karsch: A Traditional Chinese Animal Medicine. *Asian J. Tradit. Med.*, 2, 45–50.
84. Silva O., Fuente C., Haney E., Ribeiro S., Hancock R. & Franco O. (2016). An anti-infective synthetic peptide with dual antimicrobial and immunomodulatory activity. *Scientific Reports.* 6 (35465).
85. Soehnlein O, Kai-Larsen Y, Frithiof R, Sorensen OE, Kenne E, Scharffetter-Kochanek K, Eriksson EE, Herwald H, Agerberth B, Lindbom L. (2008). Neutrophil primary granule proteins HBP and HNP1-3 boost bacterial phagocytosis by human and murine macrophages. *J Clin Invest.*;118(10):3491-502. doi: 10.1172/JCI35740. PMID: 18787642; PMCID: PMC2532980.
86. Stanaway, J. (2019). The global burden of non-typhoidal salmonella invasive disease : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Infect Dis*, 19, 1312–1324. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30418-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30418-9)
87. Su, B.-C., & Chen, J.-Y. (2017). Antimicrobial Peptide Epinecidin-1 Modulates MyD88 Protein Levels via the Proteasome Degradation Pathway. *Marine Drugs*, 15(11), 362. <https://doi.org/10.3390/md15110362>
88. Takeda, K., & Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh186>
89. Tawfik MM, Bertelsen M, Abdel-Rahman MA, Strong PN, Miller K. (2021). Scorpion Venom Antimicrobial Peptides Induce Siderophore Biosynthesis and Oxidative Stress Responses in *Escherichia coli*. *mSphere.* 12;6(3): e00267-21. doi: 10.1128/mSphere.00267-21. PMID: 33980680; PMCID: PMC8125054.
90. Torres-Larios, A., Gurrola, G.B., Zamudio, F.Z., Possani, L.D., (2000). Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur. J. Biochem.* 267, 5023e5031
91. Turvey SE. & Broide DH. (2010). Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 125 (2): S24 – 32. doi: 10.1016/j.jaci.2009.07.016.
92. Verma ND, Boyd R, Robinson C, Plain KM, Tran GT, Hall BM. (2006). Interleukin-12p70 prolongs allograft survival by induction of interferon gamma and nitric oxide production. *Transplantation* 82:1324–33. doi:10.1097/01. tp.0000239519. 56358.c1
93. Wagner C, Hensel M. (2011). Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. *Adv Exp Med Biol*; 715:17-34; PMID:21557055; . 1007/978-94-007-0940-9_2

94. Wang L, Zhao X, Xia X, Zhu C, Zhang H, Qin W, Xu Y, Hang B, Sun Y, Chen S, Jiang J, Zhang G, Hu J. (2019). Inhibitory Effects of Antimicrobial Peptide JH-3 on *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strain CVCC541 Infection-Induced Inflammatory Cytokine Release and Apoptosis in RAW264.7 Cells. *Molecules*. 7;24(3):596. doi: 10.3390/molecules24030596. PMID: 30736473; PMCID: PMC6384860.
95. Wang, A., Chen, F., Wang, Y., Shen, M., Xu, Y., Hu, J., ... Wang, J. (2013). Enhancement of Antiviral Activity of Human Alpha-Defensin 5 against Herpes Simplex Virus 2 by Arginine Mutagenesis at Adaptive Evolution Sites. *Journal of Virology*, 87(5), 2835–2845.
96. Wang, S., Huang, S., Ye, Q., Zeng, X., Yu, H., Qi, D., & Qiao, S. (2018). Prevention of Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression in Mice with the Antimicrobial Peptide Sublancin. *Journal of Immunology Research*, 2018, 4353580. <https://doi.org/10.1155/2018/4353580>
97. Wang, S., Ye, Q., Wang, K., Zeng, X., Huang, S., Yu, H., ... Qiao, S. (2019). Enhancement of Macrophage Function by the Antimicrobial Peptide Sublancin Protects Mice from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Immunology Research*, 2019, 3979352. <https://doi.org/10.1155/2019/3979352>
98. Wen, X., Gehring, R., Stallbaumer, A. *et al.* Limitations of MIC as sole metric of pharmacodynamic response across the range of antimicrobial susceptibilities within a single bacterial species. *Sci Rep* 6, 37907 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep37907>
99. Wu, S., Zhang, F., Huang, Z., Liu, H., Xie, C., Zhang, J., ... Qiao, S. (2012). Peptides Effects of the antimicrobial peptide cecropin AD on performance and intestinal health in weaned piglets challenged with *Escherichia coli*. *Peptides*, 35(2), 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.03.030>
100. Xu D, Liao C, Xiao J, Fang K, Zhang W, Yuan W, et al. (2019). Human enteric defensin 5 promotes *Shigella* infection of macrophages. *Infect Immun.*;88(1): e00769-e819
101. Yacoub, T., Rima, M., Karam, M., & Fajloun, J.-M. S. A. Z. (2020). Antimicrobials from Venomous Animals: An Overview. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(10), 2402. <https://doi.org/10.3390/molecules25102402>
102. Yang L, Sun Y, Xu Y, Hang B, Wang L, Zhen K, Hu B, Chen Y, Xia X, Hu J. (2020). Antibacterial Peptide BSN-37 Kills *Extra-* and *Intra-*Cellular *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium by a Nonlytic Mode of Action. *Front Microbiol.* 7; 11:174. doi: 10.3389/fmicb.2020.00174. PMID: 32117178; PMCID: PMC7019029.
103. Yunchao D., Liu X., Bu., Li. & Zhang S. (2012). Antimicrobial–immunomodulatory activities of zebrafish phosvitin-derived peptide Pt5. *Peptides*. 37 (2): 309 – 313.
104. Zhang, QY., Yan, ZB., Meng, YM. *et al.* (2021). Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Med Res* 8, 48. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2>
105. Zhang, R., Eckert, T., Lutteke, T., Hanstein, S., Scheidig, A., Bonvin, A. M. J. J., ... Siebert, H.-C. (2016). Structure-Function Relationships of Antimicrobial Peptides and Proteins with Respect to Contact Molecules on Pathogen Surfaces. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(1), 89–98.