

## ESTUDIO DEL EFECTO DEL PÉPTIDO FK-13NH<sub>2</sub> EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA EN MACRÓFAGOS MURINOS DURANTE EL DESAFÍO CON *TRICHOMONAS VAGINALIS*

Marco Antonio Barajas Mendiola <sup>a\*</sup>, Daniela Linares Fajardo <sup>a</sup>, María Guadalupe González González <sup>a</sup>, Patricia Cuéllar Mata <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Inmuno-microbiología molecular, Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, C.P. 36050,

[ma.barajasmendiola@ugto.mx](mailto:ma.barajasmendiola@ugto.mx)

### Resumen

*Trichomonas vaginalis* es un parásito protozoario causante de la tricomoniasis, una enfermedad de transmisión sexual no viral que afecta a mujeres y a hombres a nivel mundial. Importantemente, cepas de *T. vaginalis* han presentado resistencia al tratamiento farmacológico de elección (metronidazol, tinidazol y secnidazol), lo que representa un importante problema de salud. Los macrófagos son componentes de la respuesta inmune innata que participan en la eliminación de los microorganismos patógenos. En la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, los péptidos antimicrobianos (PAMs) han emergido como compuestos prometedores. Particularmente, el péptido FK13NH<sub>2</sub>, un derivado de la catelicidina humana LL-37, ha mostrado actividad tricomonicida y baja toxicidad en células humanas. Sin embargo, su efecto sobre la modulación inmune de macrófagos frente a *T. vaginalis* no ha sido estudiado. En el presente trabajo se exploró el efecto del péptido FK13NH<sub>2</sub> sobre la producción de óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno (ROS), y de la expresión citocinas como la IL-10 en macrófagos RAW264.7 durante el desafío con el aislado clínico de *T. vaginalis* GT21 (*TvGT21*). Aquí, mostramos que el péptido FK13NH<sub>2</sub> induce de manera significativa la producción de NO en macrófagos murinos, mientras que en macrófagos previamente tratados con el péptido y desafiados con el parásito, la producción de NO se redujo considerablemente. Lo anterior coincidió con el nivel de expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), en donde se observó un aumento significativo en el nivel de expresión de la iNOS en macrófagos tratados con el péptido, mientras que en macrófagos previamente tratados y posteriormente desafiados con

*TvGT21*, el nivel de expresión disminuyó considerablemente. Además, el péptido FK13NH<sub>2</sub> indujo de manera significativa la producción de ROS en los macrófagos, mientras que en macrófagos previamente tratados con el péptido y posteriormente desafiados con *TvGT21*, la producción de las ROS disminuye significativamente. Notablemente, no se observaron cambios significativos en el nivel de expresión de la IL-10 en macrófagos únicamente tratados con el péptido FK13NH<sub>2</sub>. Sin embargo, el pre-tratamiento con el péptido FK13NH<sub>2</sub> abatió totalmente la expresión de la IL-10 en macrófagos desafiados con el parásito. Estos resultados sugieren que FK13NH<sub>2</sub> modula la producción de NO, ROS y la expresión de citocinas como la IL-10, las cuales son clave en la regulación de la respuesta efectora de los macrófagos, que podrían limitar la inflamación exacerbada inducida por *T. vaginalis*.

*Palabras clave:* Tricomoniasis, FK13NH<sub>2</sub>, macrófagos, inmunomodulación.

## **STUDY OF THE EFFECT OF THE ANTIMICROBIAL FK-13NH<sub>2</sub> PEPTIDE ON MODULATION OF THE INNATE IMMUNE RESPONSE IN MURINE MACROPHAGES DURING *TRICHOMONAS VAGINALIS* CHALLENGE**

### **Abstract**

*Trichomonas vaginalis* is a protozoan parasite that causes trichomoniasis, a non-viral sexually transmitted disease affecting both males and females worldwide. Importantly, *T. vaginalis* strains have shown resistance to pharmacological treatments (metronidazole, secnidazole, and tinidazole), representing a significant health problem. Macrophages are components of the innate immune response that participate in the elimination of pathogenic microorganisms. In the search for new therapeutic alternatives, antimicrobial peptides (AMPs) have emerged as promising compounds. In particular, the FK-13NH<sub>2</sub> peptide, derived from the human LL-37 cathelicidin, has demonstrated trichomonicidal activity and low toxicity in human cells. However, its effect on immune regulation in macrophages exposed to *T. vaginalis* has not been studied. In this work, we explore the effect of the FK-13NH<sub>2</sub> peptide on nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) production, as well as cytokine expression such as IL-10, in RAW264.7 macrophages during challenge with the clinical isolate GT21 of *T. vaginalis* (*TvGT21*). Here, we show that the FK-13NH<sub>2</sub> peptide significantly induces NO production in murine macrophages, while in macrophages pre-treated with the peptide and then

challenged with *T. vaginalis*, this NO production was considerably reduced. The above coincided with the expression level of inducible nitric oxide synthase (iNOS), where a significant increase in iNOS expression was observed in macrophages treated with the peptide. In contrast, in macrophages pre-treated with the peptide and then challenged with *T. vaginalis*, iNOS expression was considerably reduced. Moreover, the FK-13NH2 peptide significantly induced ROS production in macrophages treated with the peptide, while in macrophages pre-treated with the peptide and then challenged with *T. vaginalis*, ROS production was significantly reduced. Notably, significant changes were not observed in IL-10 expression in macrophages treated with the FK-13NH2 peptide, but pre-treatment with the FK-13NH2 peptide completely reduced IL-10 expression in macrophages challenged with *T. vaginalis*. These findings suggest that the FK-13NH2 peptide modulates both NO and ROS production, as well as the expression of cytokines such as IL-10, which are key in the effector response of macrophages and could limit the exacerbated inflammation induced by *T. vaginalis*.

**Keywords:** tricomoniasis, FK-13NH2, macrophages, immunomodulation.



## 1. Introducción

*Trichomonas vaginalis* es el agente causal de la tricomoniasis, una de las enfermedades de transmisión sexual no viral más común a nivel mundial, afectando de manera importante tanto a mujeres como a hombres (Rowley y col., 2019; Workowski y col., 2021). En mujeres, la infección por *T. vaginalis* se ha asociado a una alta susceptibilidad de contraer el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de papiloma humano (VPH), así como un elevado riesgo de desarrollar cáncer cérvico-uterino (Yang y col., 2018; Van Gerwen y col., 2021). Además, en mujeres gestantes, la infección con *T. vaginalis* está asociada a partos prematuros y bajo peso del neonato (Van Gerwen y col., 2021) mientras que en hombres, esta infección está asociada al desarrollo de cáncer de próstata (Al-Samarrai y Harneed, 2022). Actualmente, el uso de los nitroimidazoles como el metronidazol y sus derivados (tinidazol y secnidazol) son el tratamiento de elección para la tricomoniasis (Nyirjesy y col., 2018; Muzny y col., 2021), no obstante, el uso de estos medicamentos conlleva efectos secundarios en los pacientes de manera dramática (náusea, vómito e intolerancia). Además, se han reportado cepas de *T. vaginalis* ya resistentes a este fármaco y

sus derivados (Nyirjesy y col., 2018), por lo que la tricomoniasis representa un grave problema de salud pública y un reto para impulsar la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

Los macrófagos (células de la respuesta inmune innata) son fagocitos profesionales cuya función principal es reconocer, engullir y eliminar a los microorganismos patógenos, y activar las funciones efectoras de los linfocitos T y B (células de la respuesta inmune adaptativa) (Varol y col., 2015; Gordon y Plüddemann, 2017). A estas células se les considera dentro de la primera línea de defensa del hospedero y un puente entre la inmunidad innata y adaptativa (Gordon y Plüddemann, 2017). Además de ser componente clave en la eliminación de los microorganismos patógenos, los macrófagos también participan importantemente en la reparación de tejidos, resolución de los procesos inflamatorios y eliminación de células tumorales (Varol y col., 2015). Lo anterior refleja una importante plasticidad fenotípica de estas células, un proceso fenotípico y funcional que se le conoce como polarización (Lee, 2019; Shapouri-Moghaddam y col., 2018).

Dentro de los mecanismos de defensa de los macrófagos, la producción de óxido nítrico (NO) es esencial para la eliminación de microrganismos patógenos, debido a que esta molécula es un fuerte oxidante capaz de dañar biomoléculas clave en la viabilidad celular (Fitzgerald y Kagan, 2020) (proteínas, lípidos, nucleótidos) (Cinelli y col., 2019). La producción de NO es catalizada por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, por sus siglas en inglés), una enzima que metaboliza el aminoácido arginina en citrulina y NO (Cinelli y col., 2019). Además de la importante actividad destructiva de microrganismos patógenos de este gas como parte de la respuesta inmune, también posee un papel regulatorio, es decir, el NO participa de manera importante en la regulación de las vías de señalización involucradas en el mantenimiento de la respuesta proinflamatoria a través de la producción de citocinas proinflamatorias, claves en la eliminación del patógeno (Fitzgerald y Kagan, 2020).

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), otro de los mecanismos de defensa de los macrófagos, es esencial para la eliminación del microorganismo patógeno fagocitado (Canton y col., 2021). Esta producción de ROS está mediada por la

enzima NADPH oxidasa la cual cataliza la reacción del anión superóxido ( $O_2^-$ ) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radicales hidroxilos (OH), todos ellos comúnmente llamados ROS (Canton y col., 2021). Además del importante papel de las ROS en eliminar a los microorganismos patógenos, también participan importantemente en la regulación de la expresión de genes de la respuesta inmune innata, entre estos la expresión de citocinas como IL-10 (Ip y col., 2017). La IL-10 es una citocina que es producida por diversas células inmunes como macrófagos y linfocitos T reguladores (Sabat y col., 2010). Importantemente, se ha demostrado que la IL-10 disminuye los procesos pro-inflamatorios, y entre estos disminuye la producción de las ROS lo que trae como consecuencia una baja efectividad de eliminación de los microorganismos patógenos (Ip y col., 2017). Notablemente, en un modelo murino de infección con *T. vaginalis*, se produce IL-10 y esto coincide con la cronicidad de la infección (Barajas-Mendiola y col., 2019).

Los péptidos antimicrobianos (AMPs, por sus siglas en inglés) son moléculas diversas, abundantes y esenciales de la respuesta inmune innata (Fazly Bazzaz y col., 2020). Las defensinas y las catelicidinas son AMPs producidos principalmente por células

epiteliales y algunos leucocitos (ejemplo: neutrófilos, macrófagos) de manera constitutiva o inducida para controlar el crecimiento microbiano (Rivas-Santiago y col., 2006). Además, su naturaleza anfipática y catiónica es la base de su defensa exitosa, debido a que estas características le permiten unirse a la membrana del microorganismo patógeno, mediante interacciones electrostáticas, comprometiendo la integridad celular (Toke, 2005). Particularmente, la catelicidina humana LL-37, ha mostrado actividad antimicrobiana en contra de una gran variedad de microorganismos patógenos (bacterias, virus, hongos y parásitos), y además también destaca por regular la respuesta inmunológica montada por el hospedero (Xhindoli y col., 2016). Se ha demostrado que secuencias cortas de este péptido, tales como FK-13NH<sub>2</sub> tienen un efecto negativo sobre el crecimiento *in vitro* de cepas de *T. vaginalis* sensibles y resistentes a metronidazol (Ramírez-Ledesma y col., 2022). Recientemente, nuestro grupo de trabajo mostró que el péptido FK13NH<sub>2</sub> tiene un efecto negativo sobre la viabilidad del aislado *T. vaginalis* GT21, y además parece ser inocuo para otros tipos celulares humanos (en estudio en nuestro laboratorio). En este sentido, este péptido representa una

alternativa terapéutica eficaz para combatir la tricomoniasis. A pesar de que en nuestro grupo de trabajo hay evidencia acumulada sobre la posible utilidad del péptido FK13NH<sub>2</sub>, debido a que se demostró su actividad tricomonicida. Se desconoce aún su efecto sobre la regulación inmunológica de componentes clave de la respuesta inmune innata como lo son los macrófagos durante su interacción con *T. vaginalis*.

De aquí que esta propuesta contribuye a comprender las bases moleculares de la acción de los péptidos antimicrobianos en el contexto hospedero-patógeno, que permitirán desarrollar nuevas estrategias terapéuticas encaminadas a disminuir el uso de medicamentos antiparasitarios los cuales han desarrollado resistencia y no son bien tolerados por el paciente.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Línea celular y cepa parasitaria

Para este proyecto se utilizó la línea celular de macrófagos de ratón RAW264.7, la cual fue mantenida en medio Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) / GlutaMax® supplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y con plasmocin® al 1% (medio

completo en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Todos los experimentos fueron realizados en medio DMEM GlutaMax® sin SFB y plasmocin® (medio incompleto). La cepa de *T. vaginalis* empleado aquí fue un el aislado de *T. vaginalis* GT21 (*TvGT21*) obtenido y axenizado de un caso positivo de tricomoniasis del estado de Guanajuato, el cual fue donado por el grupo de trabajo del Dr. Luis Felipe Padilla Vaca de la Universidad de Guanajuato. La cepa *TvGT21* fue mantenida en medio TYI-S-33 suplementado con suero adulto bovino (SAB) al 6% a 37°C

## 2.2. Ensayo de cuantificación de nitrito

La evaluación de la producción de NO se realizó de manera indirecta mediante el ensayo de Griess modificado (Arias-Negrete y col., 2004). Brevemente, 2.5x10<sup>5</sup> macrófagos RAW264.7 fueron colocadas en placas de 96 pozos en medio completo e incubadas en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Posteriormente, los macrófagos fueron estimulados con el lipopolisacárido bacteriano (LPS, 10 ng/mL), como control positivo de activación, FK13NH<sub>2</sub> (FK13, 50 μM); y desafiados con la cepa *TvGT21* a una multiplicidad de infección (MOI) 1:1 (célula: parásito) durante 2 horas. Despues, los macrófagos se

parásito) durante 2 horas a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Finalmente, para llevar el ensayo de Griess, 100 μL de cada uno de los sobrenadantes fueron usados adicionando 50 μL de sulfanilamida (reactivo A) y 50 μL de N-naftil-etilendiamina (reactivo B). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, en ausencia de luz durante 30 minutos. La cantidad de nitrito fue medida mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm usando una curva de calibración estándar de nitrito.

## 2.3. Detección de ROS

La detección de las ROS liberados por los macrófagos bajo los diferentes estímulos, se determinó mediante el ensayo de Nitroblue Tetrazolium (NBT) (Sim Choi y col., 2006). 5x10<sup>5</sup> macrófagos RAW264.7 se colocaron en placas de 96 pozos en medio completo e incubadas en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Luego, los macrófagos fueron estimulados con el lipopolisacárido bacteriano (LPS, 10 ng/mL), como control positivo de activación, FK13NH<sub>2</sub> (FK13, 50 μM); y desafiados con la cepa *TvGT21* a una multiplicidad de infección (MOI) 1:1 (célula: parásito) durante 2 horas. Despues, los macrófagos se

incubaron en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C por 40 min. Posteriormente, se eliminó el

NBT no reducido, se lavaron con metanol al 70%, y se les adicionó KOH (2mM, 110 µL)

y DMSO (140 µL). Finalmente, las ROS liberadas fueron medidas por espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm.

### 2.3. RT-PCR semicuantitativa

Para evaluar la expresión de la iNOS y de la IL-10 se realizó mediante PCR punto final. Brevemente, 1x10<sup>6</sup> macrófagos RAW264.7 fueron colocadas en cajas de 6 pozos en medio completo e incubadas en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Luego, los macrófagos fueron estimulados con el lipopolisacárido bacteriano (LPS, 10 ng/mL), FK13NH<sub>2</sub> (FK13, 50 µM), durante 24 horas, y desafiados o no con la cepa *TvGT21* a una multiplicidad de infección (MOI) 1:1 (célula: parásito) durante 2 horas. Los macrófagos fueron colectados para aislar ARN total usando el reactivo TRIZOL®Reagent, de acuerdo con las especificaciones del proveedor. La concentración del ARN total fue cuantificada por espectrofotometría y la integridad y pureza (libre de DNA genómico)

del ARN total fue evaluada en gel de agarosa al 1%. 1 µg de ARN total se usó para realizar la síntesis de cDNA empleando el sistema SuperScrip™III First-Strand Synthesis System, de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Finalmente, 250 ng de cDNA fueron usados para realizar la PCR empleando el sistema PCR SuperMix de acuerdo con las especificaciones, las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador MultiGene Thermal Cycler Labnet. Los oligonucleótidos usados en este trabajo se muestran en la tabla 1. El gen GAPDH fue empleado como control endógeno de amplificación génica en la reacción. El análisis densitométrico para evaluar el nivel de expresión relativa de los genes fue realizado en el software ImageJ que se encuentra de forma gratuita.

## 3. Resultados

El óxido nítrico es una pequeña molécula inorgánica que está implicada en diversas funciones fisiológicas. Su papel en células

inmunes como los macrófagos, en parte, es funcionar como un fuerte oxidante para degradar microorganismos patógenos

fagocitados (Cinelli y col., 2019; Fitzgerald y col., 2020). Además, se ha descrito que los

**Tabla 1.** Lista de oligonucleótidos murinos usados en los ensayos de RT-PCR semicuantitativa\***m:** murino, **iNOS:** Óxido Nítrico Sintasa inducible; **IL-10:** Interleucina 10; **GAPDH:** Gliceraldehído 3

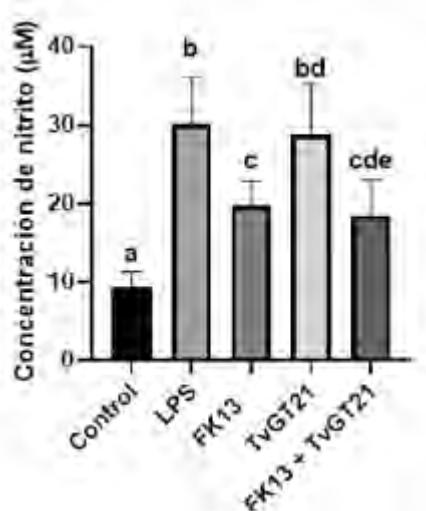
Fosfato Deshidrogenasa

Gen	Secuencia 5' → 3'	Tm (°C)	Producto de amplificación (pb)
<b>miNOS Directo</b>	CCGAATTCTGGCT CCAGCATGTAC	56	170
<b>miNOS Reverso</b>	CAGGATCCGTCT CACAGGGCTG		
<b>miIL-10 Directo</b>	CTGCTGTTGGAA ACGGACATC	55	563
<b>miIL-10 Reverso</b>	GGTGGGAAGAAC ATTCGCCT		
<b>mGAPDH Directo</b>	TCCCTCAAGATT GTCAGCAA	51	300
<b>mGAPDH Reverso</b>	AGATCCACAACG GTAACATT		

AMPs como las defensinas y las catelicidinas regulan de manera importante la producción de NO contribuyendo en la respuesta efectora (pro-inflamatoria) de los macrófagos (Zughaier y col., 2005; Rivas-Santiago y col., 2006; Li y col., 2023). En el presente trabajo decidimos evaluar el efecto del péptido FK13NH<sub>2</sub> sobre la producción de NO durante el desafío con *T. vaginalis* (*TvGT21*), mediante el ensayo de Griess modificado, el

cual evalúa indirectamente el NO producido a través de la producción de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). El tratamiento de los macrófagos murinos con el péptido FK13NH<sub>2</sub> (50 μM) indujo de manera significativa la producción de nitrito (19.68 μM), sin embargo, esta producción fue significativamente menor que en células tratadas con LPS (30.82 μM) (Figura 1). Además, cuando los macrófagos fueron desafiados con *TvGT21*, la producción de

nitrito ocurrió a niveles similares a aquellos producidos por el LPS ( $28.80 \mu\text{M}$ ) (Figura 1). Notablemente, la producción de nitrito disminuyó, aunque de manera no significativa, en macrófagos previamente tratados con el péptido y desafiados con el parásito ( $18.41 \mu\text{M}$ ), tanto como con el tratamiento con FK13NH<sub>2</sub> ( $20 \mu\text{M}$ ) (Figura 1). Además, el nivel de producción de nitrito en la condición anteriormente mencionada es similar al de las células únicamente tratadas con el péptido (Figura 1).



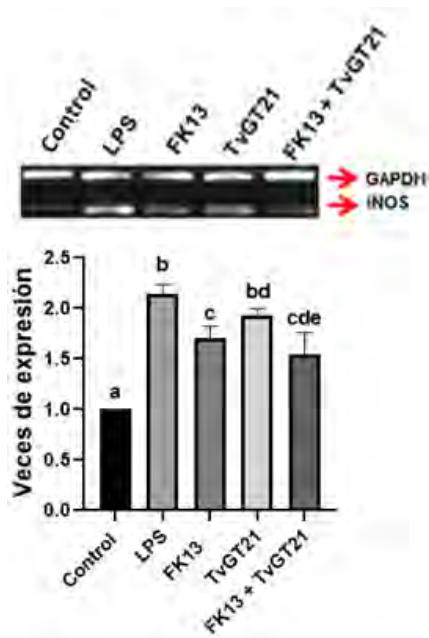
**Figura 1.** Efecto del péptido FK13NH<sub>2</sub> sobre la producción de óxido nítrico en macrófagos murinos desafiados con *TvGT21*.

Los macrófagos RAW264.7 fueron tratados con lipopolisacárido bacteriano (LPS,  $10\text{ng/mL}$ ) como control positivo de activación; con el péptido FK13NH<sub>2</sub> (FK13,

$50\text{mM}$ ) y desafiadas con *TvGT21* (*TvGT21* y *TvGT21* + FK13) (MOI 1:1). Macrófagos sin tratamiento fueron usados como control negativo (Control). Las barras son representativas de 3 experimentos independientes expresados como la media  $\pm$  error estándar. Diferentes letras denotan diferencias significativas entre los tratamientos (Kruskal-Wallis y Dunn's test,  $p \leq 0.05$ ).

La óxido nítrico sintasa (iNOS) es la enzima que participa en la producción de NO a través del metabolismo del aminoácido arginina y se ha demostrado que la expresión de esta enzima contribuye al control y eliminación de microrganismos patógenos (Cinelli y col., 2019). Sin embargo, una alta expresión de esta enzima contribuye a un estado proinflamatorio exacerbado que puede tener consecuencias deletéreas en el hospedero (Cinelli y col., 2019). Algunos AMPs como la catelicidina LL37 reducen la expresión de la iNOS y por ende la producción de NO, reduciendo, en parte, el estado proinflamatorio exacerbado en el hospedero (Zughaier y col., 2005). Así, evaluamos el efecto del péptido FK13NH<sub>2</sub> sobre la expresión de la iNOS en macrófagos murinos desafiados con *T. vaginalis*. El péptido FK13NH<sub>2</sub> ( $50 \mu\text{M}$ ) indujo de manera

significativa la expresión de la iNOS (1,7 veces) en macrófagos murinos a niveles similares a aquellos inducidos por el LPS (2,14 veces) y el aislado de *T. vaginalis* GT21 (1,93 veces) (Figura 2). Notablemente, cuando los macrofagos fueron previamente tratados con péptido y posteriormente desafiados con el parásito, el nivel de expresión de expresión de la iNOS disminuyó considerablemente (1,54 veces) con respecto a los macrófagos que solo fueron desafiados con el aislado de *T. vaginalis* GT21 (Figura 2).

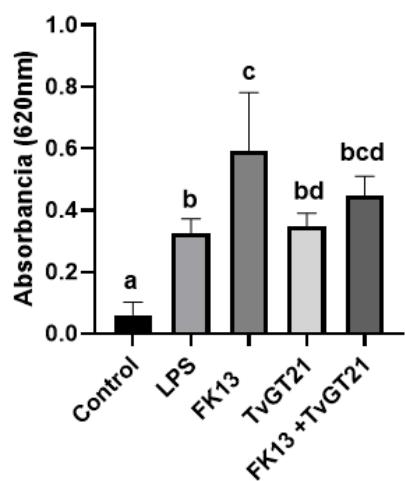


**Figura 2.** Efecto del péptido FK13NH<sub>2</sub> sobre la expresión de la iNOS en macrófagos murinos desafiados con *TvGT21*.

$1 \times 10^6$  macrófagos RAW264.7 fueron colocadas en placas de 6 y tratadas con lipopolisacárido bacteriano (**LPS**, 10ng/mL), como control positivo de activación; el péptido **FK13NH<sub>2</sub>** (**FK13**, 50mM) y desafiadas con ***TvGT21*** (***TvGT21*** y **FK13 + *TvGT21***) (MOI 1:1). Las células se incubaron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 24 horas. GAPDH fue usado como control interno de amplificación y todas las condiciones fueron normalizadas con respecto a células sin tratamiento (**Control**). Las barras son representativas de 2 experimentos independientes expresados como la media  $\pm$  error estándar. Diferentes letras denotan diferencias significativas entre todos los tratamientos (Kruskal-Wallis y Dunn's test,  $p \leq 0.05$ )

Para evaluar el efecto del péptido FK13NH<sub>2</sub> sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), los macrófagos RAW264.7 se estimularon con lipopolisacárido bacteriano (LPS) y FK13NH<sub>2</sub>, en presencia o en ausencia del aislado clínico *TvGT21*. La producción de ROS fue medida por espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm de forma cualitativa mediante el ensayo de NBT (Sim Choi y col., 2006). Los resultados obtenidos muestran que los macrófagos tratados con el péptido FK13NH<sub>2</sub>

incrementan de manera significativa su producción de las ROS (Figura 3), incluso mayor al inducido por el LPS o por *TvGT21* (Figura 3). Notablemente, la producción de las ROS se redujo considerablemente cuando los macrófagos fueron previamente tratados con el péptido FK13NH<sub>2</sub> y posteriormente desafiados con *TvGT21* (Figura 3).



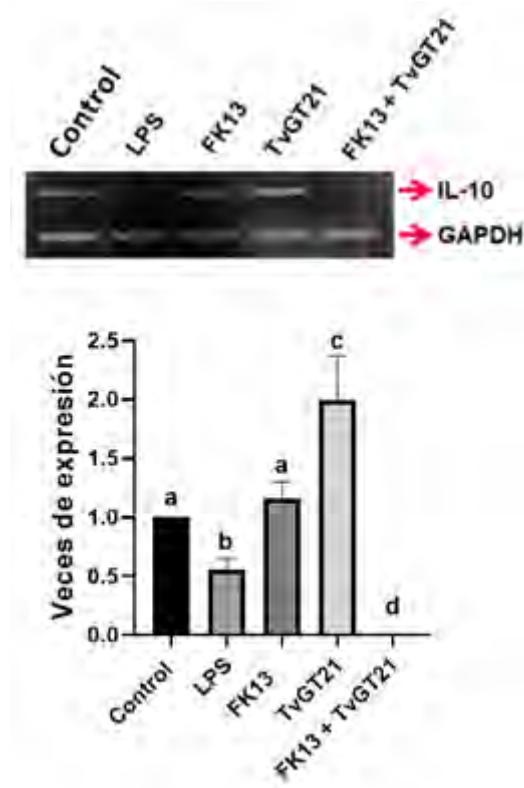
**Figura 3.** Efecto del péptido FK13NH<sub>2</sub> sobre la producción de ROS en células RAW264.7 desafiadas con *TvGT21*.

5x10<sup>5</sup> macrófagos RAW264.7 fueron colocadas en placas de 96 pozos y tratadas con lipopolisacárido bacteriano (**LPS**, 500 ng/mL), el péptido FK13NH<sub>2</sub> (**FK13**, 50mM) y desafiadas con *TvGT21* (**TVGT21** y **FK13 + TVGT21**) (MOI 1:1). Las células se incubaron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 45 minutos. La producción de ROS fue medida de manera cualitativa mediante espectrofotometría a una longitud de onda de

620nm, macrófagos RAW264.7 sin tratamiento (**Control**) fueron usados como control negativo. Las barras son representativas de 3 experimentos independientes expresados como la media ± error estándar. Diferentes letras denotan diferencias significativas entre todos los tratamientos (Kruskal-Wallis y Dunn’s test, *p* ≤ 0.05)

Además de ser clave en eliminar a los microorganismos patógenos, las ROS también participan de forma importante en la regulación de vías de señalización como en la expresión de genes de la respuesta inmune innata, siendo la expresión IL-10 una de las vías de señalización más importantes (Sabat y col., 2010; Ip y col., 2017). Por ello, se evaluó el efecto del péptido FK13NH<sub>2</sub> sobre la expresión de la citocina IL-10 en macrófagos murinos durante el desafío con *TvGT21*. Los resultados mostraron que no hubo cambios significativos en los niveles de expresión de la IL-10 en macrófagos estimulados con el péptido FK13NH<sub>2</sub> (Figura 4). Sin embargo, un aumento significativo fue observado en macrófagos únicamente desafiados con *TvGT21* (1,99 veces) (Figura 4), y sorprendentemente la expresión de la IL-10

no fue detectable en macrófagos previamente tratados con el péptido y posteriormente desafiados con el parásito (Figura 4).



**Figura 4.** Efecto del péptido FK13NH<sub>2</sub> sobre la expresión de la IL-10 en macrófagos murinos desafiados con *TvGT21*.

$1 \times 10^6$  macrófagos RAW264.7 fueron colocadas en placas de 6 y tratadas con lipopolisacárido bacteriano (**LPS**, 10ng/mL), el péptido FK13NH<sub>2</sub> (**FK13**, 50 $\mu$ M) y desafiadas con *TvGT21* (*TvGT21* y **FK13 + TvgT21**) (MOI 1:1). Las células se incubaron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 24 horas. GAPDH fue usado como

control interno de amplificación y todas las condiciones fueron normalizadas con respecto a células sin tratamiento (**Control**).

Las barras son representativas de 2 experimentos independientes expresados como la media  $\pm$  error estándar. Diferentes letras denotan diferencias significativas entre todos los tratamientos (Kruskal-Wallis y Dunn's test,  $p \leq 0.05$ )

#### 4. Discusión

El óxido nítrico (NO) producido por los macrófagos es un mecanismo crucial de defensa frente a patógenos. Su síntesis depende de la actividad de la enzima iNOS, activada por estímulos inflamatorios como citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) o moléculas secretables o asociadas a los patógenos como el LPS (Cinelli y col., 2019; Fitzgerald y col., 2020). Además de su acción microbicida, el NO puede regular la respuesta inmune innata. Por ejemplo, se ha descrito que el NO promueve la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y quimiocinas (IL-8) a través de la activación y traslocación al núcleo del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Cinelli y col., 2019).

Se ha reportado que los péptidos derivados de LL-37 (por ejemplo: KR12, KR20) no solo son eficaces en contra de diversos microorganismos patógenos, sino también como moduladores del sistema inmune (Xhindoli y col., 2016; Ramírez-Ledesma y col., 2022). En este estudio, se observó que FK13NH<sub>2</sub>, al igual que *T. vaginalis*, induce la producción de NO en macrófagos murinos de manera significativa (Figura 1). Notablemente, en macrófagos previamente tratados con el péptido, se redujo la producción de NO en presencia del parásito a concentraciones similares a los obtenidos en macrófagos únicamente tratados con el péptido (Figura 1). Una sobreproducción sostenida de NO puede resultar perjudicial, ya que se asocia con daño tisular, neurodegeneración y sepsis (Cinelli y col., 2019). Aquí, *T. vaginalis* induce una sobreproducción de NO durante la infección (Giulia y Tasca, 2023), lo cual sugiere que la expresión y la actividad de la iNOS puede estar siendo sobre-expresada (Cinelli y col., 2019; Giulia y Tasca, 2023). Nuestros resultados muestran una expresión diferencial del gen de la iNOS en macrófagos tratados con el péptido FK13NH<sub>2</sub> a niveles similares a los inducidos por LPS y *TvGT21* (Figura 2), lo cual coincide con la producción de nitrito

observada bajo las mismas condiciones (Figura 1). Es interesante puesto que se ha reportado que el péptido LL37 tiene funciones contrarias a las observadas aquí por el péptido FK13NH<sub>2</sub>, el cual es un derivado del LL37 (Zughaijer y col., 2005; Li y col., 2023). Esto sugiere que probablemente otros dominios encontrados en el péptido completo estén participando de manera importante en la inhibición de la respuesta pro-inflamatoria por parte del hospedero.

La producción de ROS constituye uno de los mecanismos clave de los macrófagos para eliminar patógenos intracelulares, ya que estas especies reactivas dañan estructuras celulares esenciales del microorganismo, contribuyendo a su muerte (Barajas-Mendiola y col., 2019). Además, las infecciones por *T. vaginalis* se han caracterizado por inducir una respuesta antiinflamatoria, principalmente a través de la sobreexpresión de IL-10 (Olmos-Ortiz y col., 2017; Barajas-Mendiola y col., 2019), y disminuyendo la producción de ROS, en consecuencia, favoreciendo la cronicidad de la infección (Ip y col., 2017). Aquí demostramos que la estimulación con FK13NH<sub>2</sub> induce un aumento significativo en la producción de las ROS en macrófagos murinos (Figura 3) y que, en presencia del

parásito, ésta disminuye considerablemente, aunque de forma no significativa (Figura 3). Esto sugiere que posiblemente *T. vaginalis*, aún en presencia del péptido, está tratando de mitigar la producción de las ROS en los macrófagos, lo cual es parte de su mecanismo de patogenicidad (Fazly Bazzaz y col., 2020). Por otra parte, se ha reportado que una exacerbada producción de las ROS está asociada a una regulación negativa de la expresión de la IL-10 (Ip y col., 2017), lo cual resalta la importancia de esta citocina en el control de la producción de las ROS y de la respuesta efectora de células de primera línea de defensa contra los patógenos como los son los macrófagos.

Aquí se muestra que el péptido FK13NH<sub>2</sub> no induce cambios significativos en el nivel de expresión de la IL-10 (Figura 4) comparado con los cambios significativos en el nivel de expresión de esta citocina en macrófagos únicamente desafiados con *T. vaginalis* (Figura 4). Notablemente este perfil de expresión de la IL-10 coincide con la cantidad de las ROS producidas en ambas condiciones (Figura 1), lo cual está en acuerdo con Olmos y colaboradores (2017) y con Barajas y colaboradores (2019), en donde demostraron que *T. vaginalis* induce la sobreexpresión de la IL-10 en un modelo murino de

tricomoniasis (Olmo-Ortiz y col., 2017), y los niveles de las ROS se ven disminuidas en el modelo *in vitro* de infección en células RAW264.7 (Barajas-Mendiola y col., 2019). Notablemente, cuando los macrófagos fueron previamente tratados con el péptido FK13NH<sub>2</sub> y posteriormente desafiados con el parásito, la expresión de la IL-10 se abatió totalmente (Figura 4), y de manera importante esto coincide con un incremento de las ROS (Figura 3). Un evento similar fue reportado por Ip y colaboradores (2017), en donde demostraron que macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica de humano nulos en el gene de la IL-10 en presencia de componentes bacterianos como el LPS, inducen una acumulación exacerbada de las ROS, promoviendo cambios metabólicos en las células que repercuten en sus funciones efectoras (Ip y col., 2017). Nuestros resultados indican que el péptido FK13NH<sub>2</sub> no solo posee actividad tricomonicida directa, como ha sido previamente reportado (Ramírez-Ledesma y col., 2022), sino que también es capaz de modular funciones efectoras de los macrófagos, como la producción de ROS a través de la expresión de citocinas clave como la IL-10.

Estos resultados sugieren que el péptido FK13NH<sub>2</sub> además de sus propiedades

antimicrobianas (Ramírez-Ledesma y col., 2022), también posee propiedades inmunoreguladoras, el cual podría limitar la inflamación exacerbada inducida por *T. vaginalis*, sin embargo, otros estudios tienen que ser realizados para comprobar lo anterior, lo anterior a través de la evaluación de la secreción de citocinas y quimiocinas mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Además, probablemente FK13NH<sub>2</sub> esté promoviendo un cambio metabólico en los macrófagos el cual induciría cambios en la respuesta efectora en contra del parásito, sin embargo, estudios son necesarios para abordar esta hipótesis.

## 5. Conclusiones

El péptido FK13NH<sub>2</sub> modifica la producción de ROS, NO y la expresión de IL-10 en macrófagos murinos durante la infección con *Trichomonas vaginalis*. Importantemente, el péptido FK13NH<sub>2</sub> además de sus propiedades microbicidas, también posee propiedades inmunoreguladoras. El doble efecto, antiparasitario e inmunoregulador, posiciona al péptido FK13NH<sub>2</sub> como un atractivo candidato terapéutico para el tratamiento de

la tricomoniasis, especialmente frente a cepas resistentes a metronidazol.

## Referencias bibliográficas

- Al-Samarrai, M., & Hameed, R. (2022). *Trichomonas vaginalis* as risk factor for prostatic diseases. *AIP Conference Proceedings*, 2394, 020015–020015. <https://doi.org/10.1063/5.0121917>
- Arias-Negrete, S., Jiménez-Romero, L. A., Solís-MartínezM. O., Ramírez-Emiliano J., Avila, E. E., & Cuéllar-Mata, P. (2004). Indirect determination of nitric oxide production by reduction of nitrate with a freeze-thawing-resistant nitrate reductase from *Escherichia coli* MC1061. *Analytical Biochemistry*, 328(1), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.01.026>
- Barajas-Mendiola, M. A., Castellano, L. E., Barrios-Rodiles, M., Deveze-Alvarez, M. A., Avila, E. E., & Cuéllar-Mata, P. (2019). Reduced *Trichomonas vaginalis* viability in mice pretreated with parasite DNA. *Parasitology*, 146(13), 1636–1645. <https://doi.org/10.1017/s0031182019001094>
- Canton, M., Sánchez-Rodríguez, R., Spera, I., Venegas, F. C., Favia, M., Viola, A., & 210

Castegna, A. (2021). Reactive Oxygen Species in Macrophages: Sources and Targets. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.734229>

Cinelli, M. A., Do, H. T., Miley, G. P., & Silverman, R. B. (2019). Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Medicinal Research Reviews*, 40(1), 158–189. <https://doi.org/10.1002/med.21599>

Fazly Bazzaz, B. S., Seyedi, S., Hoseini Goki, N., & Khameneh, B. (2020). Human Antimicrobial Peptides: Spectrum, Mode of Action and Resistance Mechanisms. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10127-2>

Fitzgerald, K. A., & Kagan, J. C. (2020). Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*, 180(6), 1044–1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041>

Giulia Bongiorni Galego, & Tasca, T. (2023). Infinity war: Trichomonas vaginalis and interactions with host immune response. *Microbial Cell*, 10(5), 103–116. <https://doi.org/10.15698/mic2023.05.796>

Gordon, S., & Plüddemann, A. (2017). Tissue macrophages: heterogeneity and

functions. *BMC Biology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0392-4>

Ip, W. K. E., Hoshi, N., Shouval, D. S., Snapper, S., & Medzhitov, R. (2017). Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science*, 356(6337), 513–519. <https://doi.org/10.1126/science.aal3535>

Lee, K. Y. (2019). M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. *Medical Biological Science and Engineering*, 2(1), 1–5. <https://doi.org/10.30579/mbse.2019.2.1.1>

Li, H., Niu, J., Wang, X., Niu, M., & Liao, C. (2023). The Contribution of Antimicrobial Peptides to Immune Cell Function: A Review of Recent Advances. *Pharmaceutics*, 15(9), 2278–2278.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics1509278>

Muzny, C. A., Schwebke, J. R., Nyirjesy, P., Kaufman, G., Mena, L. A., Lazenby, G. B., Van Gerwen, O. T., Graves, K. J., Arbuckle, J., Carter, B. A., McMahon, C. P., Eder, S., Shaw, J., Pandey, B., & Chavouastie, S. E. (2021). Efficacy and Safety of Single Oral Dosing of Secnidazole for Trichomoniasis in Women: Results of a Phase 3, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Delayed-

Treatment Study. **Clinical Infectious Diseases**, 73(6), e1282–e1289.  
<https://doi.org/10.1093/cid/ciab242>

Nyirjesy, P., & Schwebke, J. R. (2018). Secnidazole: next-generation antimicrobial agent for bacterial vaginosis treatment. *Future Microbiology*, 13(5), 507–524. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0270>

Olmos-Ortiz, L. M., Barajas-Mendiola, M. A., M. Barrios-Rodiles, Castellano, L. E., S. Arias-Negrete, Avila, E. E., & P. Cuéllar-Mata. (2017). Trichomonas vaginalis exosome-like vesicles modify the cytokine profile and reduce inflammation in parasite-infected mice. *Parasite Immunology*, 39(6).  
<https://doi.org/10.1111/pim.12426>

Ramírez-Ledesma, M. G., Rodríguez, M. C., Nayeli Alva-Murillo, & Avila, E. E. (2022). The antimicrobial peptides LL-37, KR-20, FK-13 and KR-12 inhibit the growth of a sensitive and a metronidazole-resistant strain of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research*, 121(12), 3503–3512.  
<https://doi.org/10.1007/s00436-022-07674-6>

Rivas-Santiago, B., Sada, E., Hernández-Pando, R., & Tsutsumi, V. (2006). Péptidos

antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Antimicrobial peptides in the innate immunity of infectious diseases. DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals)*.

Rowley, J., Vander Hoorn, S., Korenromp, E., Low, N., Unemo, M., Abu-Raddad, L. J., Chico, R. M., Smolak, A., Newman, L., Gottlieb, S., Thwin, S. S., Broutet, N., & Taylor, M. M. (2019). Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bulletin of the World Health Organization*, 97(8), 548–562P.  
<https://doi.org/10.2471/blt.18.228486>

Sabat, R., Grütz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K., & Geginat, J. (2010). Biology of interleukin-10. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21(5), 331–344.  
<https://doi.org/10.1016/j.cytofr.2010.09.002>

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6425–6440.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.26429>

Sim Choi, H., Woo Kim, J., Cha, Y., & Kim, C. (2006). A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 27(1), 31–44. <https://doi.org/10.1080/15321810500403722>

Toke, O. (2005). Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers*, 80(6), 717–735. <https://doi.org/10.1002/bip.20286>

Van Gerwen, O., Craig-Kuhn, M., Jones, A., Schroeder, J., Deaver, J., Buekens, P., Kissinger, P., & Muzny, C. (2021). Trichomoniasis and adverse birth outcomes: a systematic review and meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 128(12), 1907–1915. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.16774>

Varol, C., Mildner, A., & Jung, S. (2015). Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 643–675. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112220>

Workowski, K. A., Bachmann, L. H., Chan, P. A., Johnston, C. M., Muzny, C. A., Park,

I., Reno, H., Zenilman, J. M., & Bolan, G. A. (2021). Sexually transmitted infections treatment guidelines, 2021. *MMWR. Recommendations and Reports*, 70(4). <https://doi.org/10.15585/mmwr.rr7004a1>

Xhindoli, D., Pacor, S., Benincasa, M., Scocchi, M., Gennaro, R., & Tossi, A. (2016). The human cathelicidin LL-37 — A pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(3), 546–566. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.003>

Yang, S., Zhao, W., Wang, H., Wang, Y., Li, J., & Wu, X. (2018). Trichomonas vaginalis infection-associated risk of cervical cancer: A meta-analysis. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 228, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2018.06.031>

Zughaier, S. M., Shafer, W. M., & Stephens, D. S. (2005). Antimicrobial peptides and endotoxin inhibit cytokine and nitric oxide release but amplify respiratory burst response in human and murine macrophages. *Cellular Microbiology*, 7(9), 1251–1262. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00549.x>

