



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS
POTOSÍ**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas

“Evaluación de fármacos como inductores de la respuesta inmune para el tratamiento de la tuberculosis”

Tesis Para obtener el grado
de Doctor en Ciencias Farmacobiológicas

Presenta:
Rodríguez Carlos Adrián

Agosto 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Posgrado en Ciencias Farmacobiológica

“Evaluación de fármacos como inductores de la respuesta inmune para el tratamiento de la tuberculosis”

Tesis Para obtener el grado
de Doctor en Ciencias Farmacobiológicas

Presenta:

Rodríguez Carlos Adrián

Co-director de tesis

Dr. Bruno Rivas Santiago

Dra Diana P. Portales Pérez

Tutores

Dra. Rosa Del Carmen Milán Segovia

Dr. Fidel Martínez Gutiérrez

Asesor Externo

Dr. Manuel Alfonso Patarroyo

Agosto 2022

Proyecto realizado en: •Unidad de Investigación Biomédica IMSS, Zacatecas ”.



El programa de Doctorado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 003383, en el Nivel 291236

Número de registro de la beca otorgada por CONACyT/CVU: 782673



“Evaluación de fármacos como inductores de la respuesta inmune para el tratamiento de la tuberculosis” por Adrián Rodríguez-Carlos se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Integrantes del Jurado

El jurado de examen está conformado por:

Dr. Bruno Rivas Santiago

Co-director de tesis

Unidad de investigación Biomédica IMSS Zacatecas

Dra Diana P. Portales Pérez

Co-director de tesis

Facultad de Ciencias Químicas / UASLP

Dra. Rosa Del Carmen Milán Segovia

Asesor

Facultad de Ciencias Químicas / UASLP

Dra. Silvia Romano Moreno

Asesor

Facultad de Ciencias Químicas / UASLP

Dra. Carmen Judith Serrano Escobedo

Asesor Externo

Unidad de investigación Biomédica IMSS Zacatecas

San Luis Potosí, S.L.P.

Agosto 10, 2022

**Comité Académico del Posgrado
En Ciencias Farmacobiológicas
Facultad de Ciencias Químicas / UASLP
Presente.**

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por el alumno de Doctorado **M en C. Adrián Rodríguez Carlos**, titulada **“Evaluación de fármacos como inductores de la respuesta inmune para el tratamiento de la tuberculosis”**, ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día 22 de agosto del 2022 a las 13:00 hrs. en el Auditorio Chico (G203), de la Facultad.

ATENTAMENTE

Dr. Bruno Rivas Santiago

Director de Tesis

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

Co-Director

Dra. Rosa Del Carmen Milán Segovia

Asesor

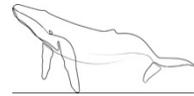
Dr. Fidel Martínez Gutiérrez

Asesor

Dr. Manuel Alfonso Patarroyo

Asesor Externo

Con dedicatoria especial a mis padres y hermanos, por todo el amor y apoyo incondicional.
A mis compañeros de trabajo por su apoyo y a mi asesor el Dr. Bruno Rivas-Santiago por
guiarme durante toda mi formación.*



“Evaluación de fármacos como inductores de la respuesta inmune para el tratamiento de la tuberculosis”

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) y representa una de las enfermedades infecciosas con mayor mortalidad y morbilidad a nivel mundial. Actualmente el tratamiento estándar para la TB implica la administración de un coctel de antibióticos de manera prolongada. La alta toxicidad de los mismos, contribuye al incumplimiento o abandono terapéutico, lo que a su vez facilita el desarrollo de cepas multifármaco-resistentes, evidenciando la necesidad de implementar y/o desarrollar nuevas estrategias para mejorar el tratamiento. Por ello, se ha propuesto el reposicionamiento de fármacos capaces de modular la respuesta inmune del huésped, entre ellos los inductores de péptidos antimicrobianos (AMPs). En las últimas décadas se ha descrito la función micobactericida de AMPs como; catelicidina (LL-37) y β -defensinas. En el presente trabajo se plantea evaluar la capacidad de inducción de AMPs de fármacos hipoglucemiantes e inhibidores de histona deacetilasa (iHDAC) durante la infección *in vitro* con Mtb.

Palabras Clave: Reposicionamiento de fármacos, Tuberculosis, respuesta inmune, Agentes hipoglucemiantes, Inhibidores de histona desacetilasa, *Mycobacterium tuberculosis*.

"Evaluation of immune response inducer drugs for the treatment of tuberculosis"

abstract

Tuberculosis (TB) is a major public health problem, which has been aggravated by the alarming growth of drug-resistant tuberculosis. Therefore, the development of a safer and more effective treatment is needed. Although diverse solutions have been proposed, one viable solution could be the use of immune system modulators. The induction of the immune response can be increased by Hypoglycemic Medications and histone deacetylase inhibitors (iHDAC). In the present study, we aimed to determine the role of anti-hyperglycemic drugs such as glyburide, insulin, and metformin to promote the killing of myco- bacteria through the regulation of innate immune molecules such as antimicrobial peptides (AMPs) in lung epithelial cells and macrophages. Therefore, using an in silico pharmacological repositioning strategy, three molecules that bind to the catalytic site of histone deacetylase were selected. Subsequently, the ability of each of these molecules to promote the elimination of mycobacterium directly or by promoting innate immune response was evaluated.

Keywords: Drug repositioning; Tuberculosis; Innate immunity; Anti-hyperglycemic drugs; Histone deacetylase inhibitors; Multidrug-resistant; *Mycobacterium tuberculosis*

Índice general

<u>“EVALUACIÓN DE FÁRMACOS COMO INDUCTORES DE LA RESPUESTA INMUNE PARA EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS”</u>	1
<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
<u>OBJETIVO</u>	2
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	2
<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	3
<u>CONCLUSIÓN</u>	4
<u>REFERENCIAS</u>	4
<u>ANEXOS</u>	5

“Evaluación de fármacos como inductores de la respuesta inmune para el tratamiento de la tuberculosis”

Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) y representa una de las enfermedades infecciosas con mayor mortalidad y morbilidad a nivel mundial. Actualmente el tratamiento estándar para la TB implica la administración de un coctel de antibióticos de manera prolongada. La alta toxicidad de los mismos, contribuye al incumplimiento o abandono terapéutico, lo que a su vez facilita el desarrollo de cepas multifármaco-resistentes, evidenciando la necesidad de implementar y/o desarrollar nuevas estrategias para mejorar el tratamiento [1]. Por ello, se ha propuesto el reposicionamiento de fármacos capaces de modular la respuesta inmune del huésped, entre ellos los inductores de péptidos antimicrobianos (AMPs). En las últimas décadas se ha descrito la función antimicrobiana de los AMPs como; catelicidina (LL-37) y β -defensinas. Dichos péptidos juegan un papel crucial en la respuesta inmune contra micobacterias, actuando directamente en la lisis del microorganismo o modulando la inmunidad [2].

Estudios *in vivo* e *in vitro* han sugerido un óptimo control de infecciones bacterianas con el uso de fármacos hipoglucemiantes como metformina, insulina y glibenclamida . Estos medicamentos muestran efectos inmunomoduladores, sin embargo, se desconoce si se encuentran involucrados en la producción de AMPs, lo que podría convertirlos en opciones terapéuticas para el tratamiento de *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) en pacientes con TB [3].

Por otra parte, los fármacos inhibidores de histona deacetilasa (iHDAC), que en su estructura conservan el grupo funcional fenilendiaminas, se ha reportado que tienen la capacidad de inducir la respuesta inmune, mediante el incremento de AMPs. Sin

embargo, considerando que su costo es elevado, se plantea el reposicionamiento de otros fármacos ya aprobados por la FDA que por sus características estructurales, muestren actividad de iHDAC [4]. Lo anterior permitiría contar con nuevas alternativas para el control de la TB.

En el presente trabajo se plantea evaluar la capacidad de inducción de AMPs de fármacos hipoglucemiantes e iHDAC durante la infección *in vitro* con Mtb.

Objetivo

Identificar fármacos inductores de AMPs durante la infección de Mtb en un modelo *in vitro*.

Materiales y metodos

Para determinar el efecto antifímico de los fármacos hipoglucemiantes, se evaluó el crecimiento de Mtb susceptible (H37Rv) en macrófagos, células mucoepiteliales y neumocitos tipo II tratadas con metformina (2mM, 4mM), glibenclamida (1 uM, 5 uM) e insulina (1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M) mediante un ensayo de Unidades formadoras de colonias (UFCs/mL) con una multiplicidad de infección (MOI) 5:1 por 48 horas. Asimismo, se determinó la expresión relativa de LL-37, y β -defensinas -2, -3 y -4 por RT-qPCR, y la expresión proteica mediante un ensayo de ELISA. Por otra parte, para la selección de los fármacos iHDAC, se realizó una búsqueda informática en la base de datos ZINC15. Las moléculas se filtraron por la aprobación de la FDA y las similitudes estructurales con el grupo fenilendiamina. Posteriormente, se evaluó la capacidad de inhibir a las HDACs *in silico* mediante la herramienta AutoDock Vina. Se seleccionaron tres moléculas: aminoacetanilida (ACE), N-Boc-1,2-fenilendiamina (N-BOC) y 1,3-Difenilurea (DFU), y se evaluó su efecto citotóxico mediante citometría de flujo. Posteriormente se determinó su efectividad antifímica durante 48 horas en neumocitos tipo II y macrófagos derivados de monocitos humanos infectados con H37Rv y Mtb resistente (MDR-

Mtb) a una MOI 5:1 por medio de UFC/mL. Finalmente se evaluó la inducción de la expresión relativa de LL-37, β -defensina - 2 y -3, así como de los marcadores de estallido respiratorio SOD3 e iNOS.

Resultados y discusión

Nuestros resultados mostraron que el uso de concentraciones terapéuticas de metformina reduce las cargas bacilares en macrófagos y células de epitelio pulmonar. Esto coincide con lo observado en los ensayos de expresión proteica, ya que reportamos un incremento en la producción de β -defensina -2, -3 y -4. Considerando que las defensinas son moléculas cruciales para el control del crecimiento de Mtb, nuestros resultados sugieren que el uso de metformina puede ser considerado como primera opción en el tratamiento de la comorbilidad DM2 - TB. De manera similar, las moléculas iHDAC seleccionadas redujeron las cargas bacilares y aumentaron la producción de β -defensina - 2, LL-37, SOD3 e iNOS en el mismo tipo celular. En general, estos resultados sugieren que las moléculas utilizadas controlan la infección de Mtb en macrófagos mediante la inducción de AMPs y el estallido respiratorio.

Por otra parte, durante la evaluación antifímica en neumocitos tipo II, solo el fármaco iHDAC - ACE disminuyó la carga bacteriana, lo que a su vez correlacionó con el incremento de la expresión de LL-37. Por lo tanto, sugerimos que las moléculas basadas en iHDAC muestran efecto antibacteriano específico según el tipo celular, para promover la respuesta inmune.

Finalmente, el uso combinado de rifampicina y iHDAC - ACE inhibió el crecimiento intracelular de MDR-Mtb en neumocitos tipo II. Aunque no se determinó el mecanismo antimicrobiano involucrado, estudios similares informaron que la combinación de vitamina D, butirato de sodio (un iHDAC) e isoniazida induce la autofagia mediada por LL-37 en células infectadas con MDR-Mtb, controlando el

crecimiento del bacilo. Por lo tanto, el mecanismo propuesto es que el iHDAC - ACE potencia la autofagia mediante la inducción observada de LL-37.

Conclusión

Considerando que los AMPs son moléculas cruciales para controlar el crecimiento de Mtb, los presentes resultados sugieren que el reposicionamiento de fármacos ofrece una nueva opción terapéutica al inducir su expresión. Proponemos el uso de la de metformina como primera opción terapéutica en pacientes que presenten la comorbilidad DM2 - TB.

Por otra parte, el uso de herramientas bioinformáticas y los ensayos *in silico* representan un gran apoyo en el mismo reposicionamiento. Mediante este enfoque logramos identificar moléculas iHDAC, las cuales se proponen como alternativas al tratamiento de TB.

Referencias

1. Organization, W.H., *Global tuberculosis report 2021*. 2021.
2. Oliveira, G.S., et al., *Antimicrobial Peptides as Potential Anti-Tubercular Leads: A Concise Review*. Pharmaceuticals (Basel), 2021. **14**(4).
3. Hegazy, W.A.H., et al., *Anti-diabetics and antimicrobials: Harmony of mutual interplay*. World J Diabetes, 2021. **12**(11): p. 1832-1855.
4. Rodríguez-Carlos, A., et al., *Modulation of cathelicidin and defensins by histone deacetylase inhibitors: A potential treatment for multi-drug resistant infectious diseases*. Peptides, 2021. **140**: p. 170527.

Anexos