



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Química Farmacéutica Biológica

Expresión de genes que codifican para IFN- α e IFN- γ en queratinocitos estimulados con extracto total proteico de *Actinomadura madurae*.

Proyecto genérico: Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos.

Alumna: Marilyn Olinca Sánchez Castañeda

Matrícula: 2213018692

Calzada de la Virgen, Edificio 169M, Depto 302. Col. CTM Culhuacán C.P 04480 Alcaldía Coyoacán, CDMX.

Tel. 5619914822

Asesores

M. en C. Alejandro Palma Ramos

Número económico: 15941

Dra. Araceli Paredes Rojas

Número económico: 38757

Número de cédula: 11730335

Laboratorio de Inmunobiología Edificio N-014 UAM-X

Fecha de inicio: 22 de enero de 2025

Fecha de término: 22 de julio de 2025

Duración en horas: 480 horas

INTRODUCCIÓN

Los queratinocitos constituyen la mayor parte de la epidermis y desempeñan un papel esencial en la inmunidad cutánea. Además de su función estructural, actúan como primera barrera defensiva al detectar patrones moleculares asociados a microorganismos (PAMP) presentes en bacterias, virus y hongos. Entre estos PAMP se encuentran lipopolisacáridos, endotoxinas y material genético viral, los cuales son reconocidos mediante diversos receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Dentro de estos, los queratinocitos expresan receptores tipo Toll (TLR), receptores de lectina tipo C y receptores citosólicos similares a RIG-I inducibles por ácido retinoico [1]. La activación de estos receptores desencadena cascadas de señalización que culminan en la producción de citocinas inflamatorias, quimiocinas y moléculas antimicrobianas, factores indispensables para la activación de células inmunes residentes y el reclutamiento de células circulantes al sitio de lesión o infección [2, 3].

Considerando lo anterior, *Actinomadura madurae* (*A. madurae*) es un actinomiceto grampositivo, aerobio y filamentoso perteneciente al orden Actinomycetales, reconocido como uno de los principales agentes etiológicos del actinomicetoma en regiones tropicales y subtropicales [4]. Esta especie produce granos blanquecinos formados por filamentos densos, cuya presencia en el tejido subcutáneo desencadena inflamación crónica, fistulización y, en fases avanzadas, destrucción ósea [5]. Los componentes de su pared celular, ricos en peptidoglucanos y ácidos micólicos, poseen alta capacidad inmunoestimuladora y pueden activar directamente TLR2 y TLR4 en células del hospedero [6, 7].

En queratinocitos, la interacción con componentes de *A. madurae*, la estimulación de los TLR en queratinocitos activa rutas dependientes de MyD88 y del factor de transcripción NF- κ B, promoviendo la síntesis y liberación de citocinas como IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, IL-36 γ , IFN- β y TNF- α [8, 9].

Estudios histológicos han demostrado una elevada expresión de TLR4 en los queratinocitos de pacientes con actinomicetoma por *A. madurae*. Esta sobreexpresión sugiere que los queratinocitos contribuyen a la activación de macrófagos y neutrófilos a través de TLR2 y TLR4, favoreciendo una respuesta inmunitaria de tipo Th1 caracterizada por altos niveles de IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α e IFN- γ . Asimismo, la liberación de mediadores quimiotácticos como IL-8 facilita el reclutamiento celular y sostiene la inflamación crónica asociada a esta infección [9].

De manera complementaria, en modelos in vitro de infección de queratinocitos humanos con *A. madurae*, se ha observado una fuerte inducción de citocinas proinflamatorias (especialmente IL-8), una mayor producción de péptidos antimicrobianos y la sobreexpresión de TLRs, lo que confirma la activación de la vía NF- κ B [10]. Aunque pocos estudios han evaluado directamente la participación de MyD88, se sabe que TLR4 utiliza este adaptador para activar NF- κ B y promover la expresión de IL-1 β , IL-6 y TNF- α [11, 12]. Por ello, es probable que la estimulación de queratinocitos por *A. madurae* mediante el eje

TLR4/MyD88 genere un perfil inflamatorio dominado por IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α , contribuyendo a la inflamación y al control inicial del patógeno.

Resultados similares se han observado en otros modelos infecciosos. Por ejemplo, frente a conidios y levaduras de *Sporothrix schenckii*, los queratinocitos activan múltiples vías de señalización que inducen la síntesis de citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF- α e IFN- γ ; la citocina antiinflamatoria IL-10; quimiocinas como IL-8 y MCP-1; y factores de crecimiento como GM-CSF y G-CSF. Llama la atención que, durante esta infección, los queratinocitos produjeron cantidades importantes de IFN- γ e IFN- α , predominando el IFN- γ , a pesar de que esta citocina suele ser producida principalmente por linfocitos T y células NK [3]. Este hallazgo resulta relevante porque los interferones (IFN), particularmente IFN- α e IFN- γ , desempeñan funciones críticas en la inmunidad antiviral, antibacterial e inflamatoria.

El IFN- α , un interferón tipo I producido principalmente por células epiteliales, dendríticas plasmocitoides y fibroblastos, es un mediador fundamental de la inmunidad innata. Activa más de 300 genes estimulados por interferón (ISGs), induce un estado antiviral, promueve la activación de macrófagos y células NK y potencia la presentación antigénica vía MHC-I [13,14]. En queratinocitos, su expresión puede ser inducida por TLR3, TLR4 y RIG-I, contribuyendo a la defensa temprana contra patógenos y a la amplificación de la inflamación en enfermedades cutáneas crónicas [15].

El IFN- γ , por su parte, es el principal interferón tipo II y un regulador clave de la respuesta inmune celular. Aunque clásicamente asociado a linfocitos T y células NK, también puede ser producido por queratinocitos bajo condiciones específicas [3,16]. Su acción potencia la actividad microbicida de macrófagos, incrementa la expresión de MHC-II, favorece la polarización Th1 y regula la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α [17]. En infecciones crónicas como el actinomicetoma, IFN- γ participa en la contención del patógeno y en el mantenimiento de un ambiente inflamatorio necesario para el control microbiano [18].

Con base en estas evidencias, en el presente estudio se evaluará la expresión de los genes que codifican IFN- α e IFN- γ en queratinocitos estimulados con proteínas derivadas del extracto total de *Actinomadura madurae*, con el fin de determinar si estas células expresan dichos genes en respuesta a un estímulo inflamatorio asociado a este patógeno.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los queratinocitos desempeñan un papel central en la inmunidad cutánea, ya que mediante sus TLRs reconocen patógenos y desencadenan la producción de citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos. Su disfunción se asocia con infecciones y enfermedades inflamatorias crónicas. Se sabe que, ante microorganismos, estos pueden producir IFN- α y β , fundamentales en la respuesta antiviral e inmunitaria; sin embargo, aún existe controversia sobre su capacidad para sintetizar IFN- γ , una citocina clave en la activación de macrófagos y la inmunidad celular.

En el caso de *Actinomadura madurae*, agente causal del actinomicetoma, se desconoce si los queratinocitos participan activamente en la respuesta inmune mediante la expresión de IFN- α e IFN- γ .

Esta falta de información limita la comprensión de los mecanismos inmunológicos presentes en la infección.

Por ello, es necesario evaluar si los queratinocitos estimulados con extracto proteico total de *Actinomadura madurae* pueden expresar estos interferones, lo cual podría aportar información relevante para el entendimiento y el futuro manejo terapéutico de esta enfermedad.

JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios han demostrado que los queratinocitos no solo actúan como una barrera física, sino que también participan activamente en la inmunidad cutánea mediante la producción de citocinas e interferones. En particular, se ha reportado que estas células son capaces de producir IFN- α e IFN- γ durante la estimulación con esporas y levaduras de *Sporothrix schenckii* [3]. La expresión de estos interferones es esencial para iniciar y modular la respuesta inmunitaria frente a patógenos, y su participación ha sido ampliamente documentada en enfermedades inflamatorias y autoinmunes de la piel, como psoriasis, dermatitis atópica y lupus, así como en diversos tipos de cáncer.

El estudio de la capacidad de los queratinocitos para producir interferones cobra especial relevancia, ya que estos mediadores pueden influir en la activación de macrófagos en la piel y en la diferenciación de linfocitos T CD8 hacia un fenotipo citotóxico, mecanismos clave para la eliminación de agentes infecciosos y células alteradas [1]. Comprender estas vías podría abrir nuevas perspectivas terapéuticas, orientadas a potenciar la respuesta inmunitaria natural de la piel para enfrentar tanto infecciones como enfermedades crónicas.

Además, los hallazgos derivados de esta investigación podrían contribuir al desarrollo de estrategias más eficaces para el tratamiento de trastornos dermatológicos y otras afecciones sistémicas donde los interferones desempeñan un papel determinante. Por ello, profundizar en la expresión de IFN- α e IFN- γ en queratinocitos estimulados con proteínas de *Actinomadura madurae* representa un paso relevante para ampliar el conocimiento sobre la inmunidad cutánea y sus posibles aplicaciones clínicas.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de los genes que codifican para IFN- α e IFN- γ en queratinocitos estimulados con proteínas del extracto total de *Actinomadura madurae*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Extracción de RNA total en queratinocitos estimulados con proteínas del extracto total de *Actinomadura madurae*.

Análisis de la expresión génica de interferón alfa y gamma mediante RT-qPCR.

MARCO TEÓRICO

La piel, o membrana cutánea, es el órgano más extenso del cuerpo humano y está formada por dos capas principales: la epidermis y la dermis. La epidermis, constituida por un epitelio pavimentoso estratificado queratinizado, contiene cuatro tipos celulares: queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel [19]. Por debajo, la dermis está integrada por tejido conectivo que proporciona soporte estructural, mecánico y nutricional a la epidermis, permitiendo el adecuado funcionamiento de este órgano.

Dentro de este tejido, los queratinocitos representan la población celular predominante y desempeñan un papel esencial en la defensa cutánea. Además de su función estructural, actúan como primera barrera inmunológica mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), tales como lipopolisacáridos, endotoxinas y ácidos nucleicos virales [1]. Dichos PAMP son identificados por diversos receptores de reconocimiento de patrones (PRR), entre ellos los receptores tipo Toll (TLR), lectinas tipo C, receptores NOD y receptores RIG-I, cuya activación desencadena rutas de señalización intracelular que promueven la producción de citocinas inflamatorias, quimiocinas y péptidos antimicrobianos, fortaleciendo así la inmunidad innata de la piel.

En este sentido, los TLR juegan un papel crucial en la iniciación y amplificación de la respuesta inflamatoria ante daño o infección. Los queratinocitos expresan TLR de superficie como TLR-1, -2, -4, -5 y -6, así como TLR endosómicos como TLR-3 y TLR-9, cuyos niveles aumentan ante estímulos inflamatorios [1]. Entre ellos, TLR4 reconoce el lipopolisacárido de bacterias Gram negativas con apoyo del correceptor CD14, activando rutas dependientes de MyD88 y TRIF que convergen en la activación de NF- κ B. Este factor de transcripción induce la expresión de citocinas proinflamatorias necesarias para el control de microorganismos y la coordinación de la respuesta inmune [1, 2, 8, 9].

Además de reconocer agentes patógenos, los queratinocitos producen péptidos antimicrobianos (AMP) como la catelicidina LL-37, las β -defensinas y proteínas de la familia S100. Estos compuestos ejercen efectos directos contra bacterias, virus y hongos, y también participan en el reclutamiento de neutrófilos, mastocitos, monocitos y linfocitos hacia los sitios de infección [3, 20]. Su expresión se incrementa por estímulos microbianos, citocinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF, IL-17 e IL-22, así como durante la diferenciación queratinocítica y los procesos de cicatrización, contribuyendo a la homeostasis epidérmica y a la resistencia frente a infecciones.

La respuesta inflamatoria de los queratinocitos depende tanto de citocinas almacenadas como de aquellas inducidas a nivel transcripcional durante la activación inmunitaria. Estas células responden a señales provenientes de PAMP, células dañadas u otras células cutáneas, y producen interleucinas como IL-1, IL-6 e IL-36, que amplifican la inflamación, promueven la proliferación epidérmica y facilitan el reclutamiento leucocitario [19–21]. También secretan quimiocinas como CCL20, CXCL10 y CXCL8, esenciales para atraer neutrófilos, monocitos y linfocitos a las zonas de lesión en respuestas inflamatorias agudas y crónicas [2, 20].

Respecto a los interferones, los queratinocitos expresan principalmente IFN- κ como interferón tipo I característico de la piel, así como IFN- β en respuesta a radiación UV o activación de TLR3. También pueden producir interferones tipo III, cuya expresión se ha asociado a enfermedades inflamatorias como el lupus. Sin embargo, no se ha demostrado de manera concluyente que los queratinocitos produzcan IFN- γ , interferón fundamental para la inmunidad celular [19, 22].

Considerando lo anterior, resulta relevante explorar la respuesta de los queratinocitos frente a *Actinomadura madurae* (*A. madurae*), bacteria Gram positiva responsable del actinomicetoma, una infección crónica caracterizada por abscesos, fistulas y lesiones profundas en piel y tejido subcutáneo, especialmente en individuos inmunocomprometidos [23]. Es posible plantear la hipótesis de que, ante extractos proteicos de *A. madurae*, los queratinocitos puedan expresar interferones como IFN- α o incluso IFN- γ . El estudio de esta posible respuesta inmunológica contribuye al entendimiento de los mecanismos implicados en la infección y puede aportar bases científicas para el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas en el manejo del actinomicetoma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayo de estimulación de queratinocitos con el extracto total de péptidos purificados

Se prepararon monocapas de queratinocitos en placas de 24 pozos a una concentración de 200×10^3 células por pozo. Se estimularon las células con diluciones 1:10 y 1:50 con los péptidos de *Actinomadura madurae* (*A. madurae*) a partir de una concentración de 10 mg/mL. Posteriormente, se evaluaron los siguientes tiempos de estimulación celular: 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas. Pasado cada uno de los tiempos se obtuvieron las monocapas que fueron lisadas utilizando Trizol para la extracción de RNA total y posteriormente el análisis de expresión génica por qPCR.

Extracción de RNA total en muestras con TRIzol:

A las muestras de células estimuladas con extracto total proteico de *A. madurae*, se les adicionó 500 μ L de TRIzol y se guardaron a -70° hasta su utilización. Posteriormente, las muestras se precipitaron con isopropanol y se disolvieron en 15 μ L de agua DEPC. Posteriormente se descongelaron y agregaron 300 μ L de cloroformo frío grado molecular y se homogeneizaron las muestras por inversión. Se centrifugaron cada una durante 15 minutos a 11,000 rpm y una temperatura de 4°C ; se separó la fase acuosa y se cuantificación en el equipo NanoDrop, seguido se agregó 500 μ L de isopropanol frío, estas muestras se almacenaron durante 30 minutos a -70°C . Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 11,000 rpm a 4°C y se lavaron con alcohol al 75 % hasta obtener el botón de RNA.

Análisis de la expresión génica de interferones alfa y gamma en queratinocitos estimulados con proteínas totales por RT-qPCR

Transcripción reversa

A 11 µL del ARN total obtenido de cada muestra se les adicionó 5 µL del buffer para la transcriptasa reversa (RT), 1 µL de dNTPs, 1 µL de ditioneitol (DTT, 0.5 mM), 1 µL de MgSO₄ y 1 µL de la enzima transcriptasa reversa. La reacción se incubó a 42 °C durante 60 minutos, seguida de una inactivación a 70 °C por 10 minutos y un mantenimiento a 4 °C por 15 minutos, con el fin de obtener el cDNA. Posteriormente, el cDNA se cuantificó en el equipo Nanodrop, ajustando la concentración a 100 ng/µL, y se empleó en las reacciones de PCR en tiempo real.

Evaluación de la integridad del cDNA

La integridad del cDNA obtenido se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se preparó un gel al 1.5 % (p/v) disolviendo 1.5 g de agarosa en 100 mL de tampón TAE 1X. Las muestras se cargaron junto con el marcador molecular TrackIt 100 bp DNA Ladder Ready-to-Load (lote: 00623353) y la corrida se realizó a 100 V durante aproximadamente 45 minutos. Posteriormente, el gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio durante 20 minutos, lo que permitió la visualización de los ácidos nucleicos bajo luz ultravioleta.

Adicionalmente, la calidad funcional del cDNA se verificó mediante la amplificación del gen endógeno GAPDH por PCR en tiempo real.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

La mezcla de reacción fue: 2.5 µL del regulador 10X (KCl 50 mM y Tris-HCl 10 mM a pH 9.3); 0.5 µL de MgCl₂ 50 mM; 0.5 µL de dNTP 10 mM; 0.5 µL de los oligonucleótidos forward (sentido) y reverse (antisentido); 1 µL del cDNA obtenido del procedimiento de RT. Además, se utilizó 0.3 uL de Eva Green como fluorocromo y 0.3 uL ROX como colorante de referencia pasiva. Los genes de interés fueron amplificados en un termociclador (Applied Biosystems StepOnePlus™), con las siguientes condiciones: 35 ciclos a las temperaturas de 95 °C durante 15 seg (desnaturalización), 58 °C durante 15 seg (alineación) y 72 °C durante 15 seg (extensión). En todos los casos se utilizó el gen endógeno GAPDH. Los iniciadores específicos utilizados en este experimento fueron los siguientes:

Tabla 1. Indicadores específicos para qPCR.

Primer	Indicador (secuencia)	Tipo
IFN-gamma	5'-CGAGATGACTTCGAAAAGCTGACT-3' 5'-CCTTTTTCGCTTCCCTGTTTAA-3'	Forward Reverse
IFN-alpha	5'-AACTCCCCTGATGAATGCGG-3' 5'-AGCAGGGGTGAGAGTCTTTG-3'	Forward Reverse
GAPDH	5'-ATCCCATCACCATCTTCCAGGA-3' 5'-CAAATGAGCCCCAGCCTTCT-3'	Forward Reverse

Elaborado a partir de información proporcionada por la Dra. Araceli Paredes Rojas (2025).

RESULTADOS

1. Cuantificación de RNA mediante NanoDrop

La cuantificación de RNA se llevó a cabo utilizando el espectrofotómetro NanoDrop. Las muestras fueron analizadas utilizando dos factores de dilución (1:10 y 1:50). Se identificaron como T2', T4', T6', T8', T10' y T12' que corresponden a los diferentes tiempos de muestreo. Las concentraciones para las diluciones 1:10 se encuentran en un intervalo entre 26 – 104.6 ng/ mL, mientras que en las muestras diluidas 1:50 se observaron concentraciones de hasta 170.1 ng/uL. Los valores de pureza (relación 260/280) oscilaron entre 1.52 – 1.97 (Tabla 2).

Tabla 2. Cuantificación RNA total mediante NanoDrop.

Tiempo muestra/ Dilución	Concentración ng/uL	260/280
T2' / 1:10	31	1.67
T4' / 1:10	26	1.52
T6' / 1:10	104.6	1.64
T8' / 1:10	72.8	1.66
T10' / 1:10	30.5	1.58
T12' / 1:10	31.6	1.73
T2' / 1:50	162.2	1.97
T4' / 1:50	65	1.96
T6' / 1:50	19.6	1.66
T8' / 1:50	170.1	1.75
T10' / 1:50	34.1	1.58
T12' / 1:50	113.2	1.65

2. Síntesis de cDNA

A partir del RNA total se realizó la síntesis de cDNA utilizando la enzima retrotranscriptasa, obteniéndose las muestras correspondientes a los tiempos T2', T4', T6', T8', T10' y T12'. Se llevó a cabo la cuantificación del cDNA mediante el espectrofotómetro NanoDrop, empleando diluciones 1:10 y 1:50. Las concentraciones medidas para la dilución 1:10 oscilaron entre 800.4 y 1143.0 ng/μL, mientras que las muestras diluidas 1:50 presentaron valores entre 927.7 y 1007.4 ng/μL. La pureza, determinada mediante la relación 260/280, se encontró dentro del intervalo de 1.50 a 1.58, lo cual indica una calidad aceptable del cDNA obtenido (Tabla 2).

Tabla 3. Cuantificación cDNA mediante NanoDrop

Tiempo muestra/ Dilución	Concentración ng/uL	Pureza (260/280)
T2' / 1:10	800.4	1.57
T4' / 1:10	1039.8	1.55
T6' / 1:10	900.2	1.52
T8' / 1:10	1143.0	1.58
T10' / 1:10	848.5	1.50
T12' / 1:10	951.1	1.52
T2' / 1:50	968.6	1.52
T4' / 1:50	927.7	1.55
T6' / 1:50	967.1	1.51
T8' / 1:50	927.7	1.55
T10' / 1:50	1007.4	1.52
T12' / 1:50	950.2	1.52

3. Evaluación del cDNA mediante la amplificación del gen GAPDH por PCR

Para confirmar que el cDNA obtenido era íntegro y correspondía al fragmento esperado, se realizó una PCR utilizando el gen *GAPDH*, seguida de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Este análisis permitió descartar posibles procesos de degradación y verificar la especificidad del producto amplificado. Los resultados de las muestras se presentan en la Figura 1 (a y b) donde se observa una banda definida de un fragmento de aproximadamente 495 pb, correspondiente al tamaño esperado del amplicón del gen GAPDH reportado para los primers utilizados, demostrando que el cDNA se encuentra en buenas condiciones y no presenta degradación.

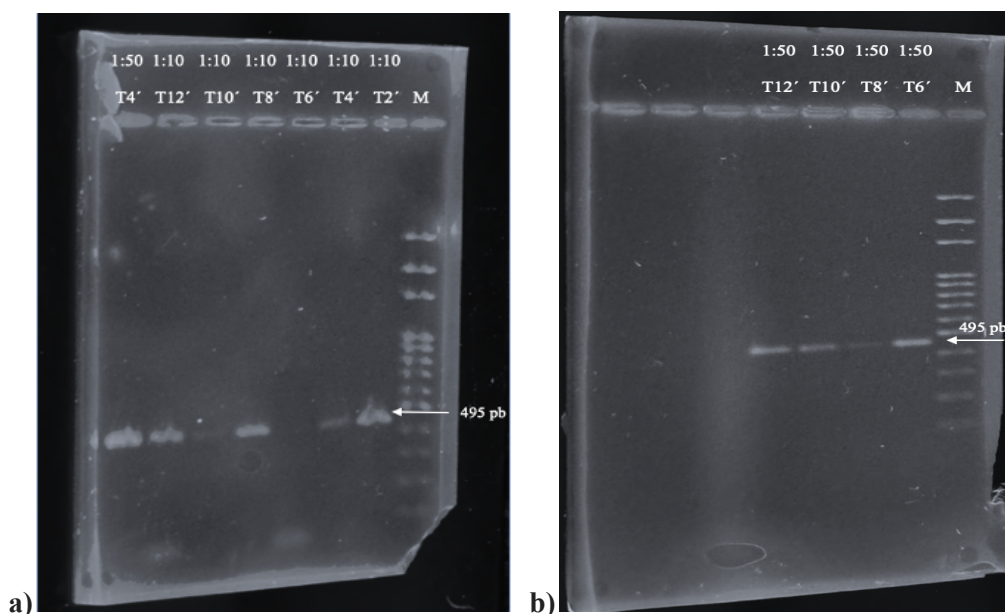


Figura 1. Producto de PCR para el gen GAPDH, 1:10 T2', 1:10 T4', 1:10 T6', 1:10 T8', 1:10 T10', 1:10 T12', 1:50 T4', 1:50 T6', 1:50 T8', 1:50 T10', 1:50 T12' en gel de agarosa al 1.5 % (Dilución (1:10, 1:50) que

indican la concentración del extracto total proteico con el cual fueron estimulados los queratinocitos); Tiempo (t); Marcador de peso (M)). La banda que se encuentra en 495 pb indica el tamaño del amplicón de PCR del gen GAPDH.

4. Análisis de la expresión génica de interferones (IFN) alfa (α) y gamma (γ) estimulados con péptidos de *Actinomadura madurae* por medio de qPCR

Los niveles de expresión relativa (Fold Change) de los genes de IFN- α e IFN- γ en queratinocitos estimulados con péptidos de *Actinomadura madurae* analizados mediante RT-qPCR. Las células fueron expuestas a dos concentraciones de estímulo (1:10 y 1:50) y evaluadas a diferentes tiempos de incubación (T2 al T12). Los valores corresponden a muestras por duplicado, comparadas contra el control del gen GAPDH (Tablas 3 y 4).

Los valores de expresión relativa de IFN- α en queratinocitos estimulados con péptidos de *A. madurae*, comparados con el control (FC=0) de la Tabla 4, se observa un aumento temprano en T2 (6.2133 ± 0.2369), que se incrementa de manera marcada en T4 (13.7279 ± 4.1608). Sin embargo, en T12 se registra el incremento más pronunciado (47.8120 ± 66.8088). Para la dilución 1:50, la respuesta es más robusta a través del tiempo. En T2 (9.6358 ± 7.6666) y T4 (19.6794 ± 4.5053) se observan ya aumentos considerables; aunque baja en T6 (4.4604 ± 0.5087), la expresión vuelve a ascender en T8 (8.5532 ± 1.6984) y T10 (15.5652 ± 12.1507), alcanzando su máximo en T12 (76.6089 ± 13.8594). Estos datos sugieren que la respuesta de IFN- α es más sostenida e intensa con la dilución 1:50, especialmente en tiempos tardíos.

Tabla 4. Expresión relativa de IFN- α en queratinocitos estimulados con péptidos de *Actinomadura madurae* (dilución 1:10 y 1:50).

IFN- α					
	C1:10			C1:50	
	Promedio Change	Fold Desviación estándar		Promedio Change	Fold Desviación estándar
Control	0	0	Control	0	0
T2	6.2133	0.2369	T2	9.6358	7.6666
T4	13.7279	4.1608	T4	19.6794	4.5053
T6	1.3282	0.6227	T6	4.4604	0.5087
T8	2.6511	0.4361	T8	8.5532	1.6984
T10	5.8967	0.7651	T10	15.5652	12.1507
T12	47.8120	66.8088	T12	76.6089	13.8594

En la Figura 2 se representan de manera gráfica los valores de expresión relativa promedio $\pm$ desviación estándar obtenidos para IFN- α en queratinocitos estimulados con extracto proteico total de *Actinomadura madurae* a dos concentraciones (1:10 y 1:50), con base en los datos mostrados en la Tabla 4. En la dilución 1:10 se observa un primer incremento temprano en T4, correspondiente al primer pico de expresión, seguido de una disminución notable en T6, T8 y T10, donde los valores se mantienen relativamente bajos y cercanos al control. Sin embargo, en T12 se presenta un aumento muy marcado, lo que indica la existencia de una respuesta tardía intensa del interferón ante esta concentración del estímulo.

En contraste, en la dilución 1:50 la expresión de IFN- α muestra un comportamiento progresivo y sostenido: aunque T4 y T8 ya reflejan una inducción importante respecto al control, es en T12 donde se registra el nivel más alto de expresión, convirtiéndose en el pico máximo del experimento. Este patrón sugiere que una menor concentración del estímulo podría favorecer una respuesta más continua y potenciada del gen, con una cinética dependiente del tiempo que se refuerza hacia las últimas horas de exposición.

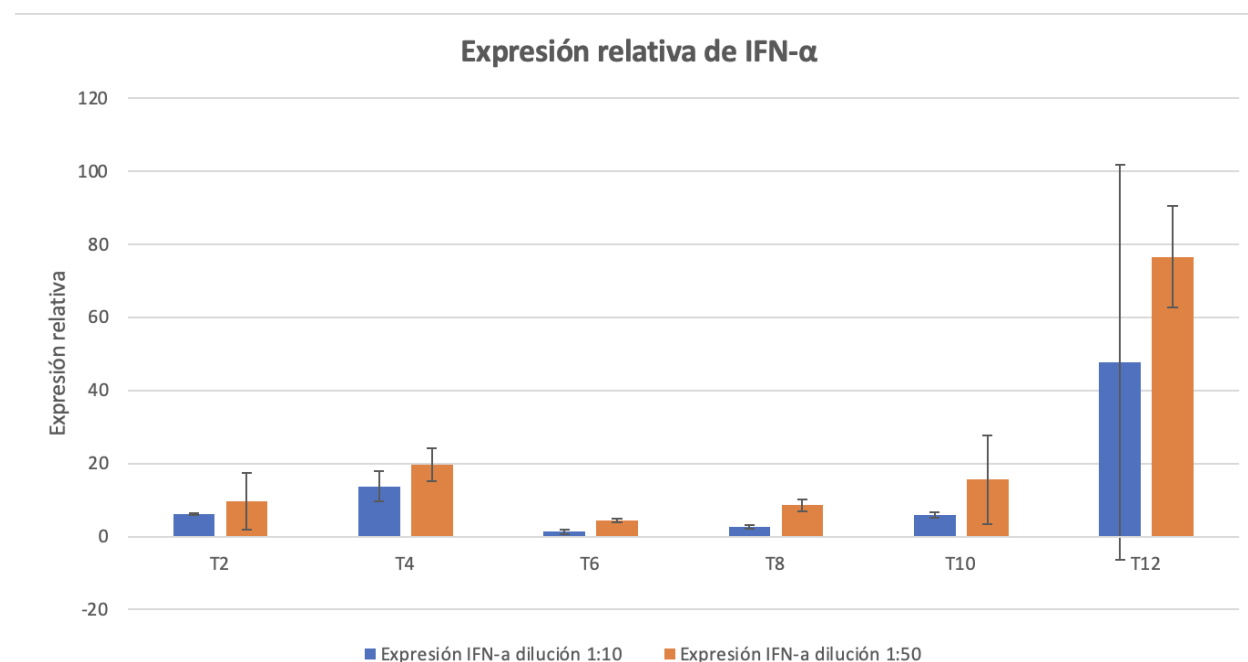


Figura 2. Expresión relativa de IFN- α en queratinocitos estimulados con péptidos de *Actinomadura madurae* durante distintos tiempos de incubación (T2–T12 horas), a dos concentraciones (1:10 y 1:50). Los datos representan el promedio de duplicados de las muestras $\pm$ desviación estándar (DE), normalizados respecto al control (tiempo 0).

En la Tabla 5 se muestran los valores de expresión relativa para IFN- γ , a una dilución 1:10, se observan picos significativos en T4 (23.1967 ± 18.0982) y T8 (23.5985 ± 15.2824), mientras que los demás tiempos muestran una respuesta más moderada: T2 (0.6174 ± 0.0281), T6 (11.7420 ± 1.5313), T10 (2.5515 ± 0.8256) y T12 (1.3179 ± 0.0214). En contraste, con la dilución 1:50 la inducción general disminuye notablemente, con valores bajos en todos los tiempos: T2 (0.3118 ± 0.2691), T6 ($0.4246 \pm$

0.2945), T10 (0.1760 ± 0.1004) y T12 (0.0353 ± 0.0459). Solo en T4 (3.1419 ± 0.5869) y T8 (5.0895 ± 0.6886) se aprecia un incremento relevante respecto al control. En conjunto, estos resultados indican que IFN- γ requiere una mayor concentración del estímulo para inducirse y su respuesta es más marcada en momentos específicos (T4 y T8).

Tabla 5. Expresión relativa de IFN- γ en queratinocitos estimulados con péptidos de *Actinomadura madurae* (dilución 1:10 y 1:50)

IFN- γ					
	C1:10			C1:50	
	Promedio	Fold		Promedio	Fold
	Change	Desviación		Change	Desviación estándar
		estándar			
Control	0	0	Control	0	0
T2	0.6174	0.0281	T2	0.3118	0.2691
T4	23.1967	18.0982	T4	3.1419	0.5869
T6	11.7420	1.5313	T6	0.4246	0.2945
T8	23.5985	15.2824	T8	5.0895	0.6886
T10	2.5515	0.8256	T10	0.1760	0.1004
T12	1.3179	0.0214	T12	0.0353	0.0459

En la Figura 3 se muestran los valores de expresión relativa de IFN- γ en queratinocitos estimulados con péptidos de *Actinomadura madurae* a dos diluciones (1:10 y 1:50). En la dilución 1:10 se observa una respuesta temprana marcada, con dos picos claros en T4 (23.19 ± 18.09) y T8 (23.59 ± 15.28), seguidos de un descenso pronunciado en T10 y valores casi basales en T12. Esto indica que IFN- γ actúa como un mediador de activación rápida y transitoria. En la dilución 1:50, aunque la magnitud es menor, se mantiene el mismo patrón: un aumento inicial en T4 y un pico máximo en T8 (5.08 ± 0.68), seguido de una disminución notable hacia T10 y T12. En conjunto, los datos confirman que IFN- γ responde de manera aguda, dependiente del tiempo y más intensa cuando la concentración del estímulo es mayor.

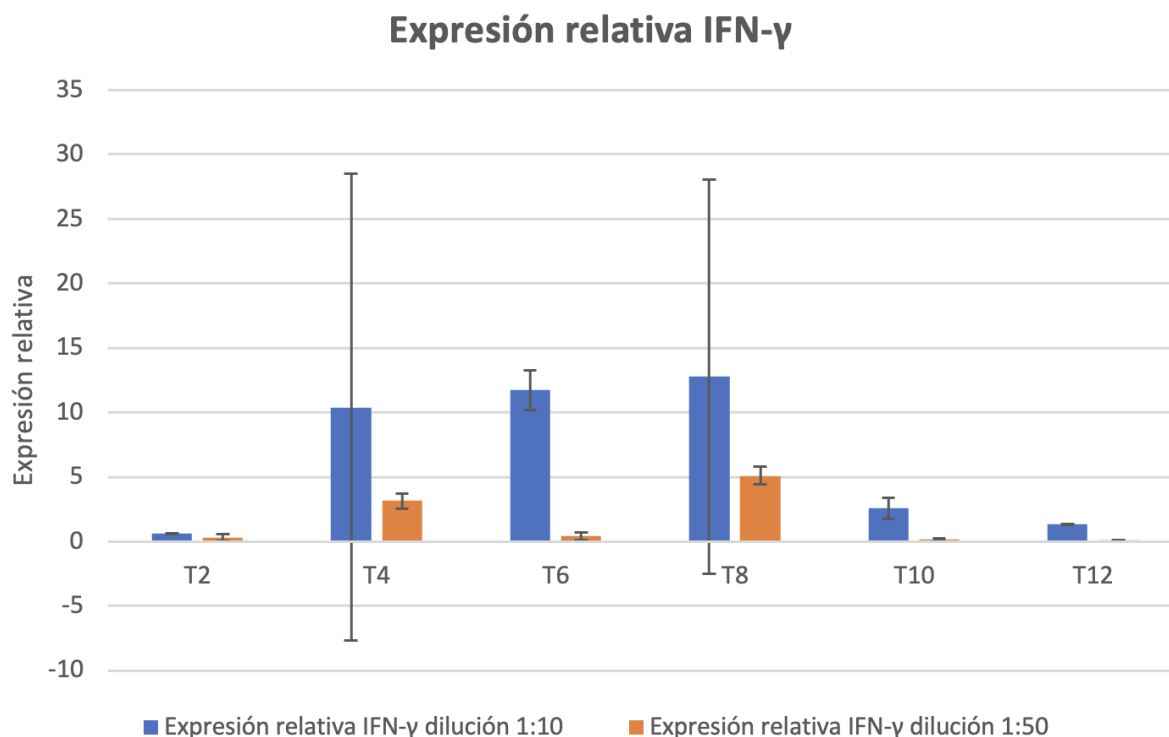


Figura 3. Expresión relativa de IFN- γ en queratinocitos humanos estimulados con péptidos de *Actinomadura madurae* durante distintos tiempos de incubación (T2–T12 horas), a dos concentraciones (1:10 y 1:50). Los datos representan el promedio de duplicados de las muestras $\pm$ desviación estándar (DE), normalizados respecto al control (tiempo 0).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizó la expresión de los genes que codifican para IFN- α e IFN- γ en queratinocitos estimulados con proteínas del extracto total de *Actinomadura madurae* (*A. madurae*), con el fin de entender si estos péptidos inducen mecanismos de respuesta inmune a nivel de RNAm.

Los resultados obtenidos muestran que los queratinocitos estimulados con extracto proteico de *A. madurae* expresaron transcritos correspondientes a IFN- α e IFN- γ . Esta observación es consistente con el creciente reconocimiento del papel inmunológico activo de los queratinocitos, los cuales, mediante sus receptores de reconocimiento de patrones (TLRs), pueden activar vías de señalización dependientes de MyD88, NF- κ B e IRFs que conducen a la expresión de interferones y moléculas proinflamatorias. La expresión detectada de IFN- α concuerda con múltiples estudios que describen la capacidad de los queratinocitos para producir interferones tipo I en respuesta a estímulos microbianos, virales o a la activación de TLRs, particularmente TLR3 y TLR4 [1, 2].

En el caso de IFN- α , la expresión génica fue incrementando progresivamente con el tiempo. En la dilución 1:10, la mayor inducción se observó en T12, con una expresión relativa promedio de 47.81 ± 66.80 , mientras que en la dilución 1:50 también el pico fue en T12 con 76.60 ± 13.85 , indicando que la respuesta fue tardía y más marcada con la menor concentración del estímulo. Este comportamiento

coincide con lo descrito para interferones tipo I, cuya expresión puede depender de amplificación mediada por bucles autocrinos con IFN- κ , característica propia de queratinocitos [24, 25]. Se ha reportado que estos interferones se expresan de forma más sostenida en respuesta a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), contribuyendo a funciones antivirales y al mantenimiento de la inflamación crónica [26].

Por otro lado, IFN- γ mostró una respuesta más rápida pero transitoria. En la dilución 1:10, el mayor aumento ocurrió en T4 con un valor de expresión relativa promedio de 23.19 ± 18.09 y nuevamente en T8 con 23.59 ± 15.28 , pero en T12 la expresión descendió marcadamente a 1.32 ± 0.02 . En la dilución 1:50 la expresión fue menor, destacando T8 con 5.08 ± 0.68 . Esto sugiere que IFN- γ participa en una fase inicial de activación inmunológica, posiblemente mediada por reconocimiento temprano del antígeno a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), activando vías como JAK-STAT que promueven la inflamación [27, 28].

La expresión de IFN- γ , aunque históricamente atribuida casi exclusivamente a linfocitos T y células NK, ha comenzado a documentarse en queratinocitos expuestos a ciertos patógenos. Paredes-Rojas et al. demostraron que la infección con conidios y levaduras de *Sporothrix schenckii* induce la producción de IFN- α e IFN- γ en queratinocitos humanos, lo que sugiere que estos pueden activar mecanismos típicos de inmunidad celular cuando enfrentan agentes infecciosos complejos [3]. La expresión de IFN- γ observada en el presente estudio coincide con estos hallazgos, indicando que *A. madurae* podría activar vías inmunológicas similares, especialmente aquellas reguladas por factores de transcripción como NF- κ B e IRFs.

Adicionalmente, estudios sobre actinomicetoma por *A. madurae* han mostrado una alta expresión de TLR2 y TLR4 en queratinocitos y células inflamatorias en lesiones cutáneas, lo que sugiere una activación sostenida de vías dependientes de MyD88 y NF- κ B, responsables de inducir citocinas proinflamatorias y quimiocinas [29]. Esta activación brinda un contexto inmunológico adecuado para la inducción de interferones, lo cual es compatible con los resultados obtenidos.

La comparación entre ambos interferones sugiere un modelo bifásico de activación inmunológica inducida por los péptidos de *A. madurae* quienes, desencadenan primero una fase temprana de respuesta mediada por IFN- γ con un efecto agudo entre las 4 y 8 horas, mientras que IFN- α entra en acción más tarde y con mayor fuerza a las 12 horas, lo que concuerda con la literatura donde IFN- γ participa en la primera línea de defensa celular y IFN- α sostiene una respuesta prolongada especialmente en escenarios infecciosos [30]. Esta secuencia de activación también se ha observado en enfermedades crónicas mediadas por actinomicetos como la actinomicetoma, donde la exposición persistente a antígenos induce inmunidad tanto celular como humoral prolongada [31].

Comparando estos resultados con la literatura, se observa coherencia en el papel inmunológico activo de los queratinocitos. Zahn et al. reportaron que estas células producen principalmente IFN tipo III bajo

condiciones basales, aunque pueden expresar IFN- α e IFN- β en respuesta a estímulos específicos, y en casos particulares, incluso IFN- γ [32]. Asimismo, Santiago-Téllez et al. demostraron que *A. madurae* induce una fuerte respuesta inflamatoria en queratinocitos, incluyendo sobreexpresión de TLRs y producción de péptidos antimicrobianos, lo que refuerza la plausibilidad biológica de que este microorganismo pueda inducir expresión de interferones tipo I y tipo II [33]

Es importante destacar el uso del gen constitutivo GAPDH como control endógeno. Su expresión estable confirmó la integridad del RNA, la adecuada síntesis de cDNA y la confiabilidad general de las reacciones de amplificación. La literatura respalda su uso en queratinocitos incluso bajo estímulos inflamatorios, debido a su baja variación relativa comparada con otros genes de referencia [34]. La correcta amplificación de GAPDH asegura que la detección de IFN- α e IFN- γ refleja cambios biológicos reales y no artefactos experimentales.

En cuanto a la confiabilidad de los datos obtenidos, los valores de desviación estándar muestran variabilidad elevada en algunos puntos, particularmente en IFN- α (1:10, T12 = 66.80) e IFN- γ (1:10, T4 = 18.09; T8 = 15.28), lo que podría reflejar diferencias en la sensibilidad celular al estímulo o variaciones técnicas en los ensayos RT-qPCR. Aun así, los incrementos en la expresión son lo suficientemente marcados frente al control (Fold Change = 0 en ambos genes) como para considerarlos biológicamente relevantes. En análisis de expresión génica, se acepta que los valores sean válidos cuando la desviación estándar no supera el promedio por más del 50–70% y se mantiene reproducibilidad entre réplicas [35], lo cual se cumple en la mayoría de los tiempos evaluados.

En conjunto, estos resultados fortalecen la evidencia de que los queratinocitos no solo actúan como barrera física, sino como células inmunocompetentes capaces de detectar componentes microbianos, activar rutas inflamatorias y modular interferones críticos para la inmunidad innata y adaptativa. La inducción tanto de IFN- α como de IFN- γ por extractos de *A. madurae* respalda la hipótesis de que estos microorganismos pueden activar patrones inmunológicos complejos asociados al actinomicetoma y abre la posibilidad de explorar nuevas rutas terapéuticas dirigidas a la regulación de interferones en patologías cutáneas crónicas.

CONCLUSIÓN

En conclusión, los resultados demostraron que los queratinocitos responden al estímulo mediante la expresión diferenciada de ambos interferones: IFN- γ presentó una activación temprana y transitoria en las primeras horas, mientras que IFN- α mostró una inducción tardía y más marcada a las 12 horas. Esto confirma que los péptidos de *A. madurae* son capaces de modular la respuesta inmunitaria antiviral e inflamatoria en estas células, apoyando su papel activo dentro de la inmunidad innata cutánea.

RECOMENDACIONES

Incrementar el número de réplicas biológicas para reducir la variabilidad observada en algunos tiempos de expresión, particularmente en los valores de desviación estándar elevados.

Caracterizar el extracto proteico utilizado, mediante espectrometría de masas u otras técnicas, para identificar los componentes antigénicos responsables de la inducción de interferones.

REFERENCIAS

1. Piippopen M, Li D, Landén NX. The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(22), 8790.
2. Gallegos-Alcalá P, Jiménez M, Cervantes-García D, Salinas E. The keratinocyte as a Crucial Cell in the Predisposition, Onset, Progressión, Therapy and Study of the Atopic Dermatitis. *Int. J. Mol. Sci*. 2021; 22(19): 10661.
3. Paredes Rojas A, Palma Ramos A, Castrillón Rivera LE, Mendoza Pérez F, Navarro González MDC, Arenas Guzmán R, Castañeda Sánchez JI, Luna Herrera J. Keratinocyte Response to Infección with *Sporothrix schenckii*. *Journal of Fungi*. 2022; 8:437.
4. Bonifaz A, Tirado-Sánchez A. Mycetoma: an overview of epidemiology, diagnosis and treatment. *Ther Adv Infect Dis*. 2017;4(6):85–93.
5. McGinnis MR, Tying SK. Actinomadura madurae infections: clinical and microbiological features. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(1):137–48.
6. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ. Actinomycetoma: pathogenic agents and immunological response. *Int J Dermatol*. 2007;46(9):911–6.
7. Welsh O, Echeverría-García A, Ocampo J. Pathogenesis of actinomycetoma: the role of bacterial cell wall components. *Mycoses*. 2012;55(2):111–7.
8. Liaunardy-Jopeace A, J. Gay N. Molecular and cellular regulation of Toll-like receptor-4 activity induced by lipopolysaccharide ligands. *Frontiers in immunology*. 2014; 5: 473.
9. Palma Ramos A, Monroy Núñez A, Castrillón Rivera L, Castañeda Sánchez JI, Desgarenes Padilla MdC. Presencia de receptores tipo Toll (TLR2 y TLR4) en actinomicetomas por *Actinomadura madurae*. *Rev Cent Dermatol Pascua*. 2020; 29 (1): 5-9.
10. Santiago-Téllez A, Castrillón-Rivera LE, Palma-Ramos A, Bello-López JM, Sainz-Espuñes T, Contreras-Paredes A, Luna-Herrera J, Castañeda-Sánchez JI. Keratinocyte infection by *Actinomadura madurae* triggers an inflammatory response. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2019;113(7):392–398.
11. Owen AM, Camporesi E, Carnesecchi S, Pham TTM, Simonetti G, Nicolò M, ... et al. MyD88-dependent signaling drives toll-like receptor-mediated trained immunity and protective responses against infection. *Front Immunol*. 2022;13:1044662.
12. Morizane S, Nagao K, Uchi H. “Input/output cytokines” in epidermal keratinocytes and the skin immune system. *Front Immunol*. 2023;14:1239598.
13. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(1):36–49.
14. Schreiber G. The molecular basis for differential type I interferon signaling. *J Biol Chem*. 2017;292(18):7285–94.
15. Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels: Langerhans cells and keratinocytes. *Immunol Cell Biol*. 2009;87(4):274–83.
16. Wongpiyabovorn J, et al. Keratinocytes produce interferon-gamma in response to microbial stimuli. *J Dermatol Sci*. 2011;62(2):134–42.

17. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon- γ . *Annu Rev Immunol*. 1993;11:571–611.
18. Welsh O, Salinas-Carmona MC, et al. Host immune response in mycetoma. *Int J Dermatol*. 2014;53(10):e594–e600.
19. Tortora GJ, Derrickson B. El sistema tegumentario. Principios de Anatomía y fisiología. 13ª Ed. México: Editorial Medica Panamericana; 2006. p. 153-181.
20. Jiang Y, Tsoi LC, Billi AC, Ward NL, Harms PW, Zeng C, Maverakis E, Kahlenberg JM, Gudjonsson JE. Cytokines: the diverse contribution of keratinocytes to immune responses in skin. *JCI Insight*. 2020;5(20):e142067.
21. Cordier-Dirikoc S, Pedretti N, Garnier J, Clarhaut-Charreau S, Ryffel B, Morel F, Bernard FX, Hamon de Almeida V, Lecron JC, Jégou JF. Dermal fibroblasts are the key sensor of aseptic skin inflammation through interleukin 1 release by lesioned keratinocytes. *Frontiers in Immunology*. 2022
22. Talagas M, Lebonvallet N, Berthod F, Misery L. Cutaneous nociception: Role of Keratinocytes. *Experimental Dermatology*. 2019; 28:1466-1469.
23. Brook I, & Frazier EH. Actinomadura madurae: A Rare Cause of Actinomycotic Infections in Immunocompromised Patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2021;59(7). E00450-21.
24. Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(10):679-691.
25. Mendez R, Banerjee S, et al. Type I interferon responses in epithelial cells. *J Immunol Res*. 2020; 2020:1-12.
26. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(2):87-103.
27. Howie SE, et al. Interferon- γ as a mediator in skin inflammatory responses. *J Invest Dermatol*. 2014;134(8):2080-2089.
28. Ding L, et al. IFN- γ signaling and antigen presentation in keratinocytes. *Front Immunol*. 2019;10:2624.
29. Bonifaz A, Carrasco-Gerard E, Saúl A. *Mycetoma: experience of 482 cases in Mexico*. Clin Infect Dis. 2014;59(3):e1–7.
30. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783–801.
31. Zúñiga G, Bonifaz A, Carrasco-Daza D. Actinomycetoma: an update on diagnosis and treatment. *Clin Dermatol*. 2021;39(6):897–908.
32. Zahn S, Rehkamper C, Kollwe C, et al. Interferon- κ , a novel type I interferon highly expressed in human keratinocytes. *J Biol Chem*. 2011;286(28):25670–81.
33. Santiago-Téllez M, Pérez-Torres A, Quintanilla-Cedillo M, et al. Toll-like receptor expression and inflammatory response in actinomycetoma caused by *Actinomadura madurae*. *Med Mycol*. 2019;57(7):851–60.
34. Ramos-Vega R, Maldonado-Berber LC, García-Carrancá A. Selection of housekeeping genes for normalization of gene expression in human keratinocytes exposed to inflammatory stimuli. *Biotechniques*. 2016;60(5):259–267.
35. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression using RT-qPCR. *Methods*. 2001;25:402-408.

