

La participación de β -defensinas y células del epitelio respiratorio en el modelo experimental de Tuberculosis Pulmonar Latente.

Juan Carlos León-Contreras*^{*}; Bruno Rivas-Santiago[§]; Eduardo Sada[‡]; Rogelio Hernández-Pando*.

Departamento de Patología, Sección de Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición S.Z.*; Unidad de Investigación Médica IMSS-Zacatecas[§]; Departamento Microbiología INER[‡].
jcleonc@hotmail.com

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa producida por bacilos del complejo tuberculosis como *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), este patógeno es capaz de producir enfermedad progresiva o infección latente [1]. En las regiones en las que la enfermedad resulta endémica el primer contacto con la micobacteria es durante la infancia, resulta importante en estos casos el papel que juega el sistema inmune puesto que es el encargado de controlar la enfermedad, solo un 10% de estos casos se llegan a desarrollar enfermedad progresiva [2,3]. Sin embargo, una vez controlada la enfermedad pueden quedar algunos bacilos dentro de tejidos en un estado en el que no se replican o lo hacen a una celeridad muy baja, a esta condición se le ha llamado tuberculosis latente caracterizándose principalmente por que es asintomática. Es de suma importancia esta condición puesto que en regiones en las que la endemidad es baja la mayoría de los casos de tuberculosis son consecuencia de la reactivación de estos bacilos en estado latente [2,3]. Se sabe que las células que tienen contacto con el bacilo en la infección primaria son los macrófagos y las células epiteliales del pulmón [4,5], así también como las células del epitelio bronquial, estas últimas pueden participar también en la eliminación de bacilos puesto que son capaces de producir moléculas relevantes para el sistema inmune como las β -defensinas descritas como péptidos antimicrobianos naturales, estas moléculas confieren también actividad quimiotáctica a las células inmunizadas [6-8]. Las defensinas son divididas en tres subfamilias, siendo los tejidos epiteliales los encargados de producir varias de las β -defensinas [9-12], de esta subfamilia las llamadas beta-defensina-humana (hBD)2 y 4 juegan un papel importante en la defensa del organismo contra infecciones bacterianas puesto que constituyen la principal barrera epitelial [9, 10]. La β -defensina murina 3 (mBD-3) es la análoga de la hBD-2 y es expresada cuando los patógenos son asociados con citocinas proinflamatorias [14, 15]. Por otro lado, también son estas moléculas las encargadas de conferir al agente patógeno receptores de reconocimiento TLR, siendo lipoarabinomannan (LAM) y ESAT los componentes de la micobacterias que interactúan con TLR-2 y -4 [16]. Es también sabido que durante la infección latente los bacilos se encuentran esencialmente ubicados en los granulomas fibróticos de los pulmones afectados donde las el microambiente de hipoxia y la escases de nutrientes los mantienen en letargo sin embargo también están presentes estos bacilos en células que no se especializan en la fagocitosis como en las células del epitelio bronquial.

Para el modelo experimental de Tuberculosis Pulmonar Latente se inocularon por vía aérea 1×10^3 bacilos de la cepa H37Rv en ratones B6D2F1 (C57BL / 6- DBA / 2J) de laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME, USA) manteniéndose en cajas con microasplantes, esta metodología fue descrita previamente en [22]. Para determinar la localización subcelular de mBD-3 en los pulmones de ratones con Tuberculosis Pulmonar Latente se procesaron fragmentos de pulmón para la técnica de Inmunomicroscopía electrónica usando el

anticuerpo contra mBD-3 en fragmentos de pulmón procesado para esta técnica obtenidos 7 meses post-infección, estos pulmones fueron perfundidos con paraformaldehído al 4% diluido en buffer de Sorensen, deshidratados con alcoholes graduados e incluidos en LR-White. Se realizaron cortes semifinos para evaluar las áreas idóneas para el estudio ultraestructural y se seleccionaron los bloques para la inmunolocalización. Los cortes finos de las muestras seleccionadas se incubaron con el anticuerpo policlonal biotinilado contra mBD-3 (Santa Cruz Laboratory, Santa Cruz California, USA) y localizado con Estreptovidina conjugada a partículas de oro de 20nm (Sigma Co., St Louis, MO, USA). Una vez localizada la mBD-3 se procedió a incubar las muestras con el anticuerpo contra LAM (Donado por M. Harboe, Universidad de Oslo) y con inmunoglobulina G (IgG) de cabra anti-conejo acoplada a oro de 20 nm. Estas rejillas se contrastaron con acetato de uranilo y se analizaron en el microscopio electrónico.

Como resultado de esta técnica se analizaron las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico mostrando que 0.5% de las células del epitelio bronquial (Células ciliadas, Células no ciliadas y Pneumocitos tipo II) presentaban micobacterias, eventualmente se encontraron macrófagos de los cuales un 2% presentaba micobacterias. Ultraestructuralmente se muestran bacilos dentro de células epiteliales ciliadas y no ciliadas con marca positiva y específica contra mBD-3 localizada alrededor de bacilos, también se muestran imágenes de pneumocitos tipo II con abundante marca contra mBD-3 evidenciando la su producción por parte de estas células. La presencia de marca contra LAM se llevo a cabo de manera conjunta para mostrar la presencia inequívoca de micobacterias, mostrando con esto la coexistencia de ambas marcas.

En conclusión, las β -defensinas son una parte fundamental de la inmunidad innata y participan de manera importante durante la infección temprana con Mtb, con este trabajo se muestra que este péptido es producido también en células epiteliales de los bronquios en el modelo experimental de Tuberculosis Pulmonar Latente y que probablemente está involucrada directamente en el mantenimiento de las micobacterias en estado latente. Este trabajo muestra también que la necesidad de estudiar y relacionar la producción de estos péptidos en individuos con enfermedad progresiva para entender mejor los mecanismos que se llevan a cabo durante la enfermedad así como también para plantear medidas encaminadas a prevenir y tratar la tuberculosis puesto que esta considerada como una enfermedad de emergencia mundial.

REFERENCIAS

- [1] Yew WW, Leung CC. Update in tuberculosis 2005. *Am J Respir Crit Care Med*;173 (2006) 491–8.
- [2] Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 6 (1998) 107–12.
- [3] Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis* 3 (2003) 578–90.
- [4] Bermudez LE, Goodman J. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun* 64 (1996) 1400–6.
- [5] Van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv Exp Med Biol*. 531 (2003) 241–7.
- [6] Durr M, Peschel A. Chemokines meet defensins: the merging concepts of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense. *Infect Immun*. 70 (2002) 6515–7.
- [7] Ackermann MR, Gallup JM, Zabner J et al. Differential expression of sheep beta-defensin-1 and -2 and interleukin 8 during acute *Mannheimia haemolytica* pneumonia. *Microb Pathog* 37 (2004) 21–7.
- [8] Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J. Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci*. 11 (2006) 1294–313.

- [9] Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Immunology*. 3 (2003) 710–20.
- [10] Bals R. Epithelial peptides in host defense against infection. *Respir Res*. 1 (2000) 141–50.
- [11] Diamond G, Zasloff M, Eck H, Brousseau M, Maloy WL, Bevins CL. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88 (1991) 3952–6.
- [12] Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M. Human b-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in the lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*. 88 (1997) 553–60.
- [13] Vora P, Youdim A, Thomas LS et al. Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol*. 173 (2004) 5398–405.
- [14] Hiemstra PS. Defensins and cathelicidins in inflammatory lung disease: beyond antimicrobial activity. *Biochem Soc Trans*. 34 (2004) 276–8.
- [15] Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J. Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci* 63 (2006) 1294–313.
- [16] Jo EK, Yang CS, Choi CH, Harding CV. Intracellular signaling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from toll-like receptors. *Cell Microbiol*. 5 (2005) 1087–98.
- [17] Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher AJ. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med* 12 (2005) 1715–24.
- [18] Rivas-Santiago B, Schwander SK, Sarabia C et al. Human {beta}-defensin 2 is expressed and associated with Mycobacterium tuberculosis during infection of human alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 73 (2005) 4505–11.
- [19] Rivas-Santiago B, Sada E, Tsutsumi V, Aguilar-Leon D, Contreras JL, Hernandez-Pando R. Beta-defensin gene expression during the course of experimental tuberculosis infection. *J Infect Dis*. 194 (2006) 697–701.
- [20] Nuermberger E, Bishai W, Grosset J. Latent tuberculosis infection. *Semin Respir Crit Care Med*. 25 (2004) 317–36.
- [21] Hernandez-Pando R, Jeyanathan M, Mengistu G et al. Persistence of DNA from Mycobacterium tuberculosis in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet*. 356 (2000) 2133–8.
- [22] Arriaga AK, Orozco EH, Aguilar LD, Rook GA, Hernandez Pando R. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 128 (2002) 229–37.
- [23] Rook GAW, Bloom BR. Mechanisms of pathogenesis in tuberculosis. In: Bloom BR, ed. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. Washington: ASM Press, (1994) 485–501.
- [24] Dannenberg AM. Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Hosp Pract*. 28 (1993) 51–8.
- [25] Lasco TM, Cassone L, Kamohara H, Yoshimura T, McMurray DN. Evaluating the role of tumor necrosis factor-alpha in experimental pulmonary tuberculosis in the guinea pig. *Tuberculosis (Edinb)*. 85 (2005) 245–58.
- [26] Iliopoulos A, Psathakis K, Aslanidis S, Skagias L, Sfrikakis PP. Tuberculosis and granuloma formation in patients receiving anti- TNF therapy. *Int J Tuberc Lung Dis*. 10 (2006) 588–590.
- [27] Opie EL, Aronson JD. Tubercle bacilli in latent tuberculous lesions and in lung tissue without tuberculous lesions. *Arch Pathol Lab Med*. 4 (1927) 1–21.
- [28] Balasubramanian V, Wiegshaus EH, Taylor BT, Smith DW. Pathogenesis of tuberculosis: pathway to apical localization. *Tuber Lung Dis*. 75 (1994) 168–78.