



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Área Químico-Biológicas

Uso de la L-Isoleucina como inmunomodulador

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A

CÉSAR ENRIQUE
RIVAS SANTIAGO
099280077

Tutor

Dr. Bruno T. Rivas-Santiago

Co Tutor

Dr. Rubén Marroquín Segura

México D.F

Enero 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria:

A **Dios** por estar siempre conmigo y darme lo necesario para poder seguir adelante.

A mis **Padres** por darme tanto amor y todo su apoyo incondicional, que me ha permitido poder seguir adelante.

A mis **Hermanos:** Bruno, Citlalli y Manolo, por haberme apoyado en todo momento.

A mi **Abuelita Emerencina**, por su amor brindado.

A **Olivia**, por toda la felicidad que has traído a mi vida.

Agradecimientos:

A mi tutor Dr. Bruno T. Rivas Santiago, por la confianza brindada durante la realización de este trabajo experimental, además por darme todo el apoyo y todo el conocimiento transmitido.

Al Dr. Eduardo Sada Díaz, por permitir incorporarme dentro de su grupo de trabajo además por el apoyo brindado y por todas sus atinadas correcciones realizadas a mi trabajo.

A mis compañeras de laboratorio por enseñarme, y ayudarme cada vez que se me atravesaban problemas, gracias: M en C. Claudia Carranza Salazar, M en C. Ma. Teresa Herrera, QFB. Carmen Sarabia León, M en C. Esmeralda Juárez Carvajal, QFB. Esther Jaime Capetillo, Dra. Martha Torres, MC Karen Bobadilla y Sra. Rosa López Serna.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando, por el apoyo y las facilidades proporcionadas para poder realizar este trabajo experimental, además por todas las ideas proporcionadas que enriquecieron este trabajo.

A la Dra. Diana Aguilar León, por la ayuda brindada y por todo lo que me enseñó lo cual fue de gran ayuda para poder realizar este trabajo.

A mis sinodales, que se tomaron la molestia de revisar mi trabajo, además quiero agradecer todas sus acertadas correcciones, muchas gracias:

- Dr. Rubén Marroquín Segura
- Q.F.B. Ma. De las Mercedes Zamudio Duran.
- Dra. Raquel Retana Ugalde
- Q.F.B. Fco. Javier Parada García.

A mis padres, por confiar en mi y darme todo su amor, gracias por todo el esfuerzo que ambos tuvieron que realizar para que yo pudiera seguir adelante, muchas gracias los amo.

CONTENIDO

RELACIÓN DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS.....	2
ABREVIATURAS UTILIZADAS.	3
RESUMEN.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
INTRODUCCIÓN:	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
MARCO TEÓRICO:	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TUBERCULOSIS:	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
INMUNIDAD INNATA:	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
INTERLEUCINAS:	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
INTERLEUCINA-8:.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
NEUTRÓFILOS EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA:	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS:	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
<i>Mecanismo de acción;</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
<i>Resistencia:</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
<i>Regulación:</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
DEFENSINAS:.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
<i>α-Defensinas:</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
<i>β-Defensinas:</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
CATELICIDINAS:.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
IMPORTANCIA DE LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN LA TUBERCULOSIS. .	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
L-ISOLEUCINA;	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
OBJETIVOS:.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
HIPÓTESIS:	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
MATERIAL Y MÉTODOS.	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
RESULTADOS:	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
DISCUSIÓN DE RESULTADOS:	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
CONCLUSIONES:	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

RELACIÓN DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS.

		Pág.
Cuadro 1	Citocinas de la inmunidad innata	12
Figura 1	Mecanismo de acción péptidos antimicrobianos	16
Figura 2	PCR convencional para GAPDH en Monocitos derivados a macrófagos (MDM)	29
Figura 3a	PCR convencional para LL-37 en MDM	30
Figura 3b	PCR convencional para HBD-2 en MDM	30
Figura 3c	PCR convencional para IL-8 en MDM	30
Figura 4	PCR convencional para GAPDH en neumocitos	31
Figura 5a	PCR convencional para LL-37 en neumocitos	32
Figura 5b	PCR convencional para HBD-2 en neumocitos	32
Figura 5c	PCR convencional para IL-8 en neumocitos	32
Grafica 1	PCR tiempo real (qPCR) para LL-37 en neumocitos 1 hora de estimulación	33
Grafica 2a	qPCR para LL-37 en neumocitos, 6 horas de estimulación	34
Grafica 2b	qPCR para LL-37 en neumocitos, 12 horas de estimulación	34
Grafica 3	qPCR para LL-37 en neumocitos, 18 horas de estimulación	35
Grafica 4a	qPCR para HBD-2 en neumocitos, 1 hora de estimulación	36
Grafica 4b	qPCR para HBD-2 en neumocitos, 6 horas de estimulación	36
Grafica 5a	qPCR para HBD-2 en neumocitos, 12 horas de estimulación	37
Grafica 5b	qPCR para HBD-2 en neumocitos, 18 horas de estimulación	37
Grafica 6a	qPCR para IL-8 en neumocitos, 1 hora de estimulación	38
Grafica 6b	qPCR para IL-8 en neumocitos, 6 horas de estimulación	38
Grafica 7a	qPCR para IL-8 en neumocitos, 12 horas de estimulación	39
Grafica 7b	qPCR para IL-8 en neumocitos, 18 horas de estimulación	39

ABREVIATURAS UTILIZADAS.

Tb	Tuberculosis
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
MTb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PRPs	Receptores para el reconocimiento del patrón
IL	Interleucina
TNF	Factor necrótico tumoral
IFN	Interferón
AMPs	Péptidos antimicrobianos
LPS	Lipopolisacárido
TLR	Receptor tipo Toll
HBD	Beta Defensina Humana
L-Ile	L- Isoleucina

RESUMEN.

La tuberculosis es una de las enfermedades más infecciosas en el mundo causando tres millones de muertes al año. Aunque no ha sido ampliamente estudiado el papel que tiene la respuesta inmune innata en la tuberculosis, se sabe que los péptidos antimicrobianos, los cuales, pertenecen a la respuesta inmune innata, tienen un papel muy importante en ésta, debido a que estos péptidos antimicrobianos ayudan a controlar el crecimiento de la bacteria y de esta manera poder controlar la enfermedad.

El objetivo de este estudio fue determinar si la L-Isoleucina, ayuda a estimular la expresión genética de algunos componentes de la respuesta inmune innata como lo son: la β – defensina humana 2 (HBD-2), la Interleucina-8 (IL-8) y la catelicidina LL-37, en células epiteliales de pulmón, además de determinar a qué concentración de L-Isoleucina y a que tiempo de estimulación existe una mayor expresión genética. Esto fue realizado utilizando cultivos celulares de monocitos y neumocitos, se expuso a diferentes concentraciones de L-Isoleucina por diferentes tiempos, se extrajo el material genético y se procedió a realizar el análisis por PCR y en caso de ser necesario por PCR en tiempo real. Los resultados nos indican que la L-Isoleucina, en células epiteliales de pulmón estimula la expresión genética de: HBD-2, IL-8 y LL-37. Para HBD-2 y LL-37 el tiempo de estimulación en el que existió una mayor expresión de estas fue a las 18 horas de estímulo, mientras que, para IL-8 se observó una mayor expresión a las 12 horas de estímulo. En los tres casos la mayor expresión se alcanzó utilizando 25 μ g de L-Isoleucina.

INTRODUCCIÓN:

La tuberculosis (Tb) es un problema muy importante de salud pública. Se publicó en el 2004 que hubo alrededor de 8.9 millones de casos alrededor del mundo, de los cuales 741,000 se presentaban en personas infectadas con VIH. De los nuevos casos el 80% viven en regiones de África, Asia y el Pacífico occidental. Además se menciona la existencia de 14.6 millones de casos prevalentes, y se detectó la muerte de 1.7 millones de pacientes infectados con esta enfermedad[3] .

En Latinoamérica entre 1986 y 1996 el número de casos notificados a la OPS/OMS ha fluctuado en general entre 230,000 y 250,000 casos nuevos de tuberculosis por año. Con base en las notificaciones producidas por los países de la región en 1996, se observa que existen en América latina, países con diferente grado de severidad en la situación de tuberculosis que permite su clasificación. Dentro de los cuales México se encuentra entre los países con una de las tasas más altas, sólo por debajo de Bolivia y Perú.

Actualmente el tratamiento contra esta enfermedad consta de 5 medicamentos de primera línea, los cuales son; isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomina. Desgraciadamente, en los últimos tiempos se ha registrado la aparición de nuevas cepas, las cuales son multidrogoresistentes, lo cual complica el tratamiento y la cura de esta enfermedad.

La primera línea de defensa a la cual se tiene que enfrentar *Mycobacterium tuberculosis* (MTb) es la inmunidad innata, esta inmunidad es inespecífica y siempre está presente[4]. Algunas moléculas pertenecientes a la inmunidad innata son la lisozima, lactoferrina, péptidos antimicrobianos y otras sustancias que se encuentran en el tracto respiratorio que tienen un carácter antimicrobiano.

En el caso de que MTb pase las barreras innatas de defensa, las primeras células a las cuales se tiene que enfrentar son los macrófagos alveolares, sin embargo se ha reportado que MTb tiende a reproducirse dentro

de los macrófagos [5]. Por lo tanto existen otros elementos de la respuesta inmune que ayudan a los macrófagos para la eliminación o control de la replicación de MTb, como lo son; péptidos antimicrobianos.

Actualmente se han buscado nuevas estrategias para el control de la Tb, y entre estas nuevas estrategias se ha trabajado con los péptidos antimicrobianos. La mayoría de estos péptidos son moléculas catiónicas con regiones hidrofóbicas, estos se pueden agrupar en tres familias las cuales son defensinas, catelicidinas e histatinas. Todos los péptidos antimicrobianos se caracterizan por tener en su estructura, una gran cantidad de aminoácidos básicos (arginina y lisina en gran parte), con lo cual la molécula tendrá carga positiva esta característica es sumamente importante en el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos [6].

En este trabajo nos enfocamos en dos diferentes tipos de péptidos antimicrobianos; las defensinas y las catelicidinas. Estos tipos de péptidos actúan principalmente sobre la membrana del microorganismo, formando poros en ella, produciendo la lisis del microorganismo [7]. Además que se ha demostrado que estos péptidos son producidos por las células epiteliales del pulmón, por lo tanto, al inducir la producción de los péptidos antimicrobianos en estas células epiteliales puede ser de mucha ayuda para el control de enfermedades como la tuberculosis. También el trabajo se enfocará en la Interleucina 8 el cual es una citosina, la cual es secretada por los macrófagos y existen reportes que también es secretada por las células epiteliales de pulmón [14]. Esta citocina actúa sobre los neutrófilos atrayéndolos al lugar de la infección, lo cual permitirá un mejor control de la infección, ya que se ha reportado que los macrófagos pueden adquirir las propiedades antimicrobianas de los gránulos de los neutrófilos [15].

MARCO TEÓRICO:

Tuberculosis:

La TB es producida por uno de los cuatro microorganismos que integran el complejo *Mycobacterium tuberculosis* y que son: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*. Sin lugar a dudas, la TB producida por *M. tuberculosis* es la más importante desde el punto de vista sanitario y la que produce la gran mayoría de los cuadros clínicos de esta enfermedad. La TB por *M. bovis* es menos frecuente en los países industrializados debido al control de la TB animal y a la pasteurización de la leche, aunque constituye todavía un problema importante en los países en vías de desarrollo. *M. africanum* es responsable de un menor número de casos de TB en África, debido a su posible menor virulencia. Finalmente, la infección por *M. microti* (agente causal de TB en roedores) ha sido recientemente descrita en humanos, principalmente en inmunodeprimidos [8].

De la estructura química de *M. tuberculosis* forman parte proteínas, carbohidratos, vitaminas del complejo B y ciertos minerales como el fósforo, magnesio y calcio. El componente proteico es el substrato fundamental que produce el fenómeno de la hipersensibilidad retardada y condiciona la aparición, más o menos precoz, de la reacción tuberculínica [8].

Aunque este microorganismo carece de una cápsula cerúlea, si posee un alto contenido en lípidos, en su mayoría químicamente complejos. De ellos, el ácido micólico es el más característico y al que se le supone la peculiaridad de su tinción, que comparte con otras especies como las nocardias y que puede modificarse según la edad del microorganismo. Su pared rica en lípidos también es responsable de varias de sus características biológicas, como la

dificultad para ser destruidos por los macrófagos y su resistencia a la desecación [9].

Otra de sus grandes características es su exageradamente lenta capacidad de división (60 veces inferior a la de un estafilococo), que es el origen de una clínica muy poco específica y de muy lenta instauración, y que también justifica que no sea necesario administrar los fármacos varias veces al día. El crecimiento de *M. tuberculosis* está subordinado a la presencia de oxígeno y al valor del pH circundante. Incluso, parece existir una interdependencia entre la disposición anatómica de la enfermedad y la tensión de oxígeno disponible en la zona [8].

En cualquier caso, las condiciones ideales de multiplicación del bacilo las encuentra a un pH de 7.40 y con una presión de oxígeno entre 100 y 140 mmHg. Sin embargo, incluso bajo estas condiciones, su multiplicación es muy lenta, oscilando entre las 14 y 24 horas.

Cuando *M. tuberculosis* no encuentra a su alrededor una situación favorable (baja tensión de oxígeno y pH bajo), éste entra en un estado latente o durmiente, pudiendo demorar su multiplicación desde varios días hasta muchos años. Este estado de latencia es también uno de los condicionantes de la perpetuación de la endemia [9].

M. tuberculosis y las otras micobacterias productoras de Tb se transmiten, de persona a persona por medio de secreciones respiratorias y saliva ya sea al estornudar, toser o inclusive hablar [10]. Es por eso que una sola gota de estas secreciones puede ser suficiente para contagiar a una persona, aunque son necesarios más factores para que se pueda dar la infección como lo son: una exposición prolongada y un mayor número de gotas

infecciosas. Daffé y colaboradores demostraron que aquellos pacientes con TB que presentan grandes cantidades de *M. tuberculosis* en su esputo, son más contagiosos que aquellos pacientes que no presentan *M. tuberculosis* en el esputo [11]. Se calcula que aproximadamente el 50 % de las personas que mantienen contacto con pacientes con extendido de esputo positivo son contagiados [11].

La Tb no tratada suele ser mortal cerca de un tercio de los pacientes muere durante el primer año después del diagnóstico y la mitad durante los cinco primeros años [9].

Inmunidad innata:

La principal función del sistema inmune es proteger al organismo contra microorganismos patógenos, normalmente se ha dividido en dos; inmunidad innata e inmunidad adquirida. Las principales diferencias entre ambas respuestas son los mecanismos y los tipos de receptores usados para el reconocimiento antigénico. En la inmunidad específica, los receptores reconocen a los microorganismos infecciosos e identifican antígenos propios y del medio. En cambio en la inmunidad innata, los receptores reconocen estructuras altamente conservadas presentes en un gran grupo de microorganismos [12]. Estas estructuras son designadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y los receptores involucrados en identificarlas son llamados receptores para el reconocimiento del patrón (PRR's) [13]. Ambas respuestas inmunes son reguladas en gran parte por un grupo de proteínas llamadas interleucinas o citocinas.

En la inmunidad innata intervienen las barreras físicas y químicas, tales como: el epitelio y las sustancias antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales. Las células Natural Killers, neutrófilos, macrófagos, leucocitos granulares. Los fagocitos realizan una labor de gran importancia, ya que son los principales productores de las citocinas: IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α y además liberan otras moléculas como: la enzima activadora del plasminógeno y fosfolipasa, radicales de oxígeno, peróxido, óxido nítrico, etc [2].

Se ha observado que las células epiteliales tienen un papel muy importante en la inmunidad innata, aunque se pensaba que estas células sólo tenían función como barrera física últimamente se ha reportado que estas tienen un papel más importante, ya que, al reconocer a los PAMPs, las células

epiteliales secretan sustancias que ayudan a la respuesta inmune innata como lo son: citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos [14].

Las plaquetas y los fagocitos mononucleares liberan citocinas tales como IL-1, TNF- α y TGF- β durante la etapa temprana de la infección, en los sitios del reconocimiento antigénico. Estas interleucinas inducen la secreción de citocinas quimiotácticas como IL-8 por las células estromales, además se da la expresión en las células endoteliales de moléculas de adhesión como son ELAM1 e ICAM1, esto es para la iniciación de acumulación de neutrófilos, macrófagos, y células NK, que producen interleucinas como IFN- γ , IL-12, IL-10, IL-15, e IL-18, que sirven para activar linfocitos T y B, y así eliminar el antígeno [2].

Interleucinas:

Las interleucinas son proteínas solubles de bajo peso molecular mediadoras de crecimiento celular, inflamación, inmunidad, diferenciación y reparación, entre otras actividades [2]. Además de las células del sistema inmune, las citocinas son producidas por diferentes tipos celulares durante la activación de la inmunidad innata y adquirida. Son el principal medio de comunicación intracelular ante una invasión microbiana. Las citocinas sirven para iniciar la respuesta inflamatoria. En el siguiente cuadro se muestran las características de las citocinas involucradas en la respuesta inmune inespecífica.

Cuadro 1
Principales características de la inmunidad innata.

Interleucina	Nombre Original	Fuentes	Estímulos	Definición
IL-1 ~17,5kDa	Factor activador de Linfocitos (LAF)	Fagocitos mononucleares activados Células epiteliales y endoteliales	Bacterias y sus productos Citocinas IL-1 y TNF Contacto con célula T CD4	Mediador de la inflamatoria en la inmunidad innata
IL-6 PM 26 kDa	Factor con actividad antiviral secretado por fibroblastos "Interferon beta 2"	Fagocitos mononucleares activados Células de endotelio vascular y fibroblastos, otras células en respuesta a IL-1 y TNF Algunas células T activadas	Virus, bacterias y sus productos IL-1, TNF, IFN y PDGF	Mediador de la respuesta de fase aguda
Quimiocinas 15 proteínas de 8 a 10 kDa	Factor quimiotáctico de neutrófilos derivado de monocitos (MDNCF) (ahora IL-8)	Subfamilia C-C por: Linfocitos T activados, Subfamilia C-X-C por: Fagocitos mononucleares activados Células tisulares (endotelio, fibroblastos) Megacariocitos	Agentes infecciosos y endotoxinas Lectinas, IL-1 y TNF-a	Mediadoras de
IL-12 PM 75 kDa	Factor estimulador de células NK (NKSF)	Células dendríticas Macrófagos, Neutrófilos	Bacterias y sus productos Microorganismos intracelulares	Puente entre inmunidad y adaptativa
INF-a ~18 kDa	Factor secretado por células infectadas con virus, capaz de interferir con la infección viral en otras células	Fagocitos mononucleares Interferon- β Fibroblastos y otras células	Infección viral Presentación de MHC-antígeno a TCR incrementada por IL-2 e IL 12 PHA o Concanavalina A	Interfieren con la replicación viral
IFN-b 20 a 23 kDa				
TNF-a PM 17 kDa	"Factor tóxico" presente en el sobrenadante de cultivos de linfocitos activados	Fagocitos mononucleares activados Células T estimuladas con antígeno Células NK y mastocitos activados	PMA, Células tumorales Mycoplasma y LPS IL-1, IL-3, TNF, GM-CSF e IFN- γ entre otros	Mediador de la respuesta a bacterias Gram (-)
IL-15 14 a 15 kDa	Linfoquina inductora de proliferación y activación de células NK	Monocitos activados Células epiteliales y Fibroblastos	Estímulos medioambientales y agentes infecciosos	Mediadora del crecimiento de células T
IL-10 PM 18 kDa	Factor inhibitorio de la síntesis de citocinas	Macrófagos activados, linfocitos T y B, y keratinocitos	Interleucinas tipo Th1	Función compleja en la regulación de la respuesta inmune
IL-18 ND	Factor inductor de IFN- γ (IGIF)	Macrófagos activados, incluyendo células de Kupffer	Microorganismos	Citocina proinflamatoria

Cuadro1. Se muestran las principales características de las citocinas involucradas en la respuesta inmune inespecífica [2]

Interleucina-8:

La interleucina 8 es una proteína de 8 a 10 kDa, la cual es secretada por células epiteliales, linfocitos T, fagocitos mononucleares activados, fibroblastos y por megacariocitos, su estimulación se produce principalmente por agentes infecciosos, por endotoxina, lectinas, IL-1 y TNF α [13].

La interleucina durante la infección micobacteriana se encarga de la quimiotaxis de neutrófilos, linfocitos T, y basófilos. Ésta es liberada en primer lugar por los macrófagos [15].

. Yuanguang y colaboradores en 1997, investigaron el papel que tienen las citocinas en la respuesta inmune contra *Mycobacterium tuberculosis* en células epiteliales de pulmón humano. Encontraron que los neumocitos humanos tipo II (A549), al ser infectados durante 24 h con *Mycobacterium tuberculosis*, aumentan la expresión de Interleucina 8 (IL-8). Lo cual atraerá neutrófilos al área de la infección [16].

Neutrófilos en la respuesta inmune innata:

Los neutrófilos, son células blancas de las llamadas granulocitos, miden de 12 a 18 μm , son las células más abundantes en sangre de los leucocitos. Se caracterizan por presentar un núcleo con cromatina compacta segmentada en 2 a 5 lóbulos conectados por delgados puentes. Es una célula muy móvil y su consistencia gelatinosa le facilita atravesar las paredes de los vasos sanguíneos y migrar hacia los tejidos para destruir microorganismos y responder a estímulos inflamatorios. La principal función de los neutrófilos es la de detener o retardar la acción de agentes infecciosos o materiales extraños. Su propiedad más importante es la fagocitosis y son capaces de ingerir bacterias y pequeñas partículas. La actividad antimicrobiana de los neutrófilos principalmente está dada por sus gránulos los cuales contienen una gran cantidad de péptidos antimicrobianos y enzimas.

Los neutrófilos entran al sitio de infección como parte de una respuesta inflamatoria, estos son atraídos por medio de citocinas como lo es la interleucina-8, y después de unas horas de llegar al tejido entra en apoptosis, para evitar la liberación de sus gránulos los cuales pueden ser tóxicos para los tejidos [17].

En el 2006 Belina H. Tan y colaboradores, observaron que, al infectar macrófagos con *Mycobacterium tuberculosis*, y al colocarlos con neutrófilos apoptóticos, la viabilidad intracelular de la bacteria disminuía. Ellos demuestran en este experimento que esta disminución de la viabilidad de la bacteria es debida a que el macrófago infectado al fagocitar el neutrófilo, absorbe sus gránulos, los cuales contienen una gran cantidad de agentes antimicrobianos como lo son: lactoferrina, catelicidinas, α -defensinas, lisozimas

entre otros. Ellos pudieron observar que los gránulos adquiridos por los macrófagos al fagocitar los neutrófilos pueden entrar a los compartimientos que contienen a la micobacteria, lo que sugiere que esto fortalece a los macrófagos, provocando el decremento de la viabilidad de la micobacteria [18]

Péptidos antimicrobianos:

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) se encuentran ampliamente distribuidos, tanto en el reino animal como en el vegetal, lo cual sugiere que los AMPs han tenido un papel muy importante en el mecanismo de defensa de los organismos multicelulares durante su evolución [6].

Es tan grande la diversidad de AMPs que es difícil de clasificarlos sin tomar en cuenta sus estructuras secundarias. El principio fundamental de la estructura de todos los AMPs es la capacidad que tienen para adaptar la forma en la cual sus partes hidrofóbicas y los aminoácidos catiónicos se organizan espacialmente dando a la molécula un carácter anfipático [6].

Todas las moléculas activas de estos péptidos están compuestas de zonas hidrofílicas, hidrofóbicas y aminoácidos catiónicos, de esta forma la molécula se puede reorganizar para darle el carácter anfipático a la molécula [19].

En humanos están divididas en 3 familias principalmente; defensinas, catelicidinas, e histatinas estas familias se organizan de acuerdo con su tamaño, su estructura y la organización de sus aminoácidos [20].

Mecanismo de acción;

Las membranas bacterianas están organizadas de tal manera que la parte más exterior de la bicapa lipídica, contiene una gran proporción de fosfolípidos cargados negativamente. En contraste las membranas de las células vegetales y animales están compuestas de lípidos sin ninguna carga [6]. Un modelo que explica la actividad de la mayoría de los AMPs es el de Shai-Matsuzaki-Huang. Este modelo propone la interacción de los AMPs con la membrana bacteriana, seguido de un desplazamiento de lípidos, una alteración de la estructura membranal formando poros en la membrana, causando así la lisis del microorganismo [1, 21] .

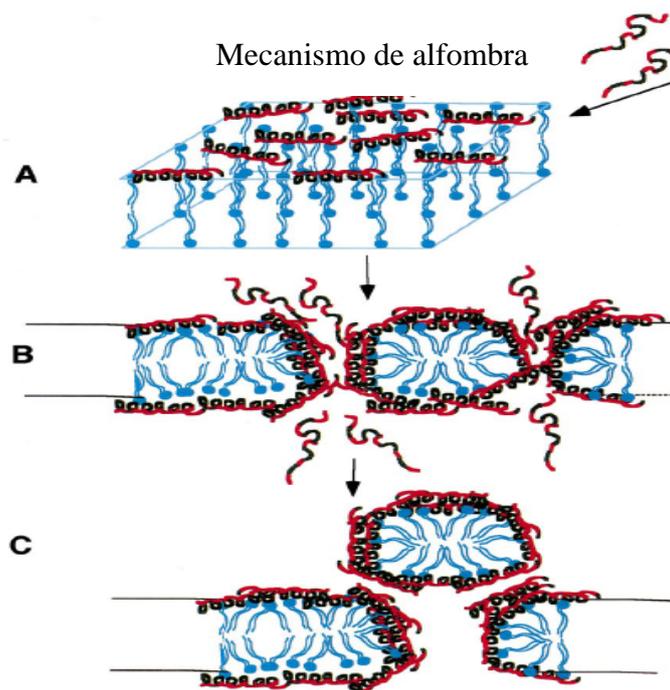


Fig 1 Modelos que sugieren como interactúan los AMPs con la membrana del microorganismo para lograr su permeabilidad. (a) Atracción por cargas de los AMPs a la membrana del microorganismo. (b) inserción de los AMPs en la membrana del microorganismo. (c) formación de poros y lisis del microorganismo [1].

Resistencia:

La obtención de resistencia por cepas bacterianas es poco probable, aunque se conocen algunas bacterias las cuales han obtenido resistencia a los AMPs. Algunos ejemplos de estas especies son: las especies del género *Morganella* y *Serratia*, las cuales en su membrana exterior contienen lípidos que carecen de las propiedades adecuadas para que exista una unión correcta con los AMPs. Otro ejemplo es la *Porphyromonas gingivalis* la cual secreta proteasas digestivas que destruyen a los péptidos. Otro microorganismo que es resistente a la acción de los AMPs es *Staphylococcus aureus*, esta bacteria secreta una proteína llamada estafilocinasa, la cual al unirse a las α -defensinas inhibe la acción bactericida de estas, también se ha observado que *S. aureus* puede inhibir la acción bactericida de la catelicidina LL-37, esto lo logra mediante la secreción de una proteína denominada aureolisina, la cual se une a las posiciones 19–20, 23–24 y 31–32 del péptido eliminando así la acción bactericida de este [22]. Pero aun así la probabilidad de que los microorganismos obtengan resistencia por si solos es muy pequeña debido a que el blanco de los AMPs es la membrana, por lo tanto para que puedan obtener resistencia los microorganismos deberían cambiar completamente la

estructura de su membrana o como ya se ha mencionado producir sustancia que inhiban la acción bactericida de estos [6].

Regulación:

La estimulación de las β -defensinas en células epiteliales esta dada por; lipopolisacáridos (LPS), interleucina 1β (IL- 1β) y factor necrótico tumoral (TNF) [23], esto es tanto en células epiteliales del tracto gastrointestinal, respiratorio y la piel. Al exponerse al estímulo las células productoras de AMPs lo reconocen por medio de receptores tipo Toll (TLR) los cuales por medio de segundos mensajeros llegan al núcleo dando como resultado un incremento en los niveles intracelulares del factor de transferencia NF κ - β , translocándose en el núcleo y así activar el gen correspondiente al AMPs. Existen otras vías por las cuales se pueden activar los genes para estos AMPs las cuales son por IRF3 y AP-1 [6].

Defensinas:

Las defensinas de los mamíferos son péptidos catiónicos, relativamente ricos en arginina, con un peso molecular de 3-4.5 kDa. Contienen invariablemente seis residuos de cisteínas, los cuales están unidos entre sí por tres puentes de disulfuro, los cuales son característicos de éstas. El número de aminoácidos que conforman estos péptidos pueden variar de 20 a 45 [24].

La familia de las defensinas se divide en: defensinas α -, β - y θ - y su clasificación se basa en la posición de los enlaces disulfuro [25]. *In vivo*, las defensinas en promedio muestran actividad antimicrobiana a concentraciones de 1-10 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, aún a concentraciones de 15-30 $\mu\text{g/mL}$ existe actividad citotóxica [26].

α -Defensinas:

Están constituidas por una cadena de 29 a 35 residuos de aminoácidos y contienen tres puentes disulfuro en las posiciones: 1-6, 2-4, 3-5[27]. Desde entonces se han identificado seis α -defensinas. Los péptidos de neutrófilos humanos 1-4 (HNP-1 al HNP-4) están localizados en los gránulos azurófilos de los neutrófilos, en donde constituyen la principal proteína (60% del total) y contribuyen eficazmente en el mecanismo oxígeno-independiente para eliminar a las bacterias fagocitadas [28].

β -Defensinas:

Las β -defensinas contienen seis residuos de cisteína conectados entre sí por tres puentes disulfuro, pero con espacios diferentes a los de las α -defensinas, por lo cual los integrantes de esta nueva familia de péptidos antimicrobianos se denominaron β -defensinas. Las β -defensinas tienen de 36 a

42 residuos de aminoácidos, además de poseer puentes disulfuro en las ubicaciones 1-5, 2-4 y 3-6. Las β -defensinas 1 (HBD-1) se expresan en tracto genitourinario y respiratorio, este tipo de defensinas son secretadas de manera constitutiva y no incrementan su expresión por estímulos infecciosos o citocinas [26].

Las β -defensinas humanas 2 (HBD-2) se encuentran en el epitelio, tales como la piel y el tracto respiratorio e intestinal. Estudios han detectado que varias células epiteliales del pulmón son capaces de expresarlas [29, 30]. Se ha observado que existe una expresión basal en las células epiteliales, pero estas aumentan la expresión de HBD-2 al ser estimuladas con moléculas asociadas a patógeno, como lo son los lipopolisacáridos, peptidoglicano, lipoarabinomanana y también se ha visto aumento de expresión al ser estimuladas con algunas citocinas proinflamatorias como son; TNF- α e IL-1 β [31].

Las β -defensinas 3 (HBD-3) son más grandes (5 kD) que las HBD-2, también son inducibles por estímulos inflamatorios y se pueden detectar *in vitro* después de la coestimulación con IL-1 β y TNF [26].

Las β -defensinas 4 (HBD-4) se han encontrado principalmente en tracto respiratorio, se ha observado que son muy efectivas contra hongos y bacterias, son inducibles por PAMPs y citocinas, y al igual que la HBD-2 es inhibida con altas concentraciones de sal [26].

Catelicidinas:

Las catelicidinas son otro tipo de péptido antimicrobiano, el cual en humano se conoce como LL-37, estas son multifuncionales y tienen un papel muy importante en la respuesta inmune. LL-37 se origina a partir de un precursor, una molécula de 18 kD denominada hCAP-18, la cual existe constitutivamente en los gránulos de los neutrófilos y es secretada por células epiteliales, monocitos, linfocitos T y células cebadas cuando estas células se encuentran en presencia de PAMP's. Se ha observado que las catelicidinas tienen un efecto antimicrobiano muy alto, y que al igual que las defensinas, este tipo de péptidos actúan sobre la membrana de los microorganismos formando poros que llevan a la lisis, y además pueden actuar directamente sobre el DNA, al unirse a los grupos fosfato del DNA por uniones electrostáticas para después insertarse en la cadena de nucleótidos del DNA impidiendo la replicación del DNA, ya que, se ha observado que la unión de LL-37 con el DNA es más fuerte que la unión que existe entre nucleótidos [26]. Se ha reportado que este péptido también tiene actividad quimiotáctica sobre neutrófilos y linfocitos, además de inducir la producción de quimiocinas [19].

La expresión de LL-37 se ha reportado que aumenta en tejidos inflamados. El gen que codifica para la producción de LL-37 contiene muchos sitios de unión para los factores de transcripción, como lo es el factor nuclear para la expresión de IL-6 (NF IL-6), el cual se piensa que tiene un papel importante en la expresión de LL-37

Importancia de los péptidos antimicrobianos en la tuberculosis.

En 1996 Miyakawa y colaboradores observaron que *in vitro* las defensinas, tienen la capacidad de matar a *M. tuberculosis* demostrando que este péptido antimicrobiano tiene su mayor efecto bactericida a una concentración de 50 µg/µl, obteniendo un mejor efecto bactericida después de 24 horas de incubación. [32]

Sharma en el 2000 observó el efecto que tienen los péptidos antimicrobianos de neutrófilos humanos (HNP-1) sobre *M. tuberculosis* cepa H37Rv *in vitro* y *ex vivo*. Concluyendo que HNP-1, tiene un potente efecto bactericida sobre *M. tuberculosis* [33]

Se sabía que los macrófagos no eran secretores de HBD-2, entonces, Kisich en el 2001, realizó un experimento en el cual, transfectaba a los macrófagos con altas cantidades de mRNA de HBD-2, obteniendo macrófagos capaces de secretar HBD-2, infectando estos macrófagos con *M. tuberculosis* observó, que los macrófagos transfectados tenían un mejor poder bactericida, así como mejor poder bacteriostático [34].

Rivas-Santiago y colaboradores pudieron observar que las HBD-2 se inducen durante la infección de células epiteliales y macrófagos con Mtb. Ellos pudieron observar que el tiempo al cual la inducción era mayor era a las 18 y 24 h de infección [35]. Continuando con esta línea de investigación Rivas-Santiago y colaboradores, utilizando un modelo animal, encontraron que las defensinas tienen un papel muy importante durante la infección con Mtb. Ellos encontraron que en la fase temprana de la infección pulmonar progresiva con Mtb existe una gran producción de defensinas pero al día 21 empieza a disminuir esta concentración de defensinas y los ratones empiezan a

manifestar los signos hasta que mueren al día 60. Mientras que durante la infección latente de tuberculosis pulmonar, los animales mantienen una producción elevada constante de defensinas, sin causar ningún efecto adverso en ellos. Estos datos obtenidos sugieren que las defensinas, ayudan al control del crecimiento bacteriano [36].

En el 2006, Rivas-Santiago y colaboradores trabajando con LL-37, demostraron que macrófagos alveolares, neutrófilos y monocitos desarrollados a macrófagos al ser infectados con *M. tuberculosis*, son capaces de expresar el gen para hCAP-18/LL-37 el cual es el precursor de LL-37. También demostraron que este péptido antimicrobiano es inducido por la estimulación de TLRs.

L-Isoleucina;

Es un aminoácido que debe ser incorporado por medio de la dieta, específicamente de alimentos que contengan proteínas, ya que nuestro organismo es incapaz de sintetizarlo. Es un componente necesario para la configuración de nuestra organización estructural y funcional sin que tengamos mecanismos para su síntesis, de ahí su denominación de esencial, puesto que el aporte tiene que ser externo [34].

Es un aminoácido hidrofóbico de cadena alifática, ramificado con grupo R isopropilo no polar. La isoleucina, junto con la valina, se sintetizan por medio de reacciones que las llevan a cabo el mismo grupo de enzimas. Una de sus ramas está formada por un grupo metilo. Este aminoácido, junto con la leucina y la hormona de crecimiento, interviene en la formación y reparación del tejido muscular [34].

En el 2000 Pascale y colaboradores, mientras estudiaban a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, encontraron que una porción de la levadura lisada, estimulaba la expresión de HBD-2. Haciendo un análisis de las diferentes porciones del lisado de levadura, encontraron que la porción que producía esta estimulación era la que estaba conformada por un aminoácido; L-Isoleucina (L-Ile). Estimulando células epiteliales de riñón bovino con diferentes concentraciones de L-Ile observaron que el mayor estímulo se daban a concentraciones entre 3 – 15 µg de L-Ile [37].

Planteamiento del problema:

El tratamiento para Tb es demasiado largo y por lo tanto costoso, lo cual implica que muchos pacientes dejen su tratamiento. Al tener datos que la L-Isoleucina induce la expresión de HBD-2 en células epiteliales de riñón bovino, pensamos que este aminoácido puede ser capaz de inducir la expresión de este AMP y otras moléculas en neumocitos pulmonares tipo 2 (A549), que puedan ayudar con el control de la Tb, y de esta manera poder utilizar este aminoácido como coadyuvante en el tratamiento para esta enfermedad y se puede ayudar a disminuir el tiempo de tratamiento y hacerlo más eficaz.

Hipótesis:

La L-Isoleucina induce la expresión de: β -defensina-2, catelicidina LL-37 y la citocina IL-8 en neumocitos tipo II y monocitos humanos derivados a macrófagos, lo cual ayuda a controlar el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*.

Objetivos:

- Determinar si L-Isoleucina induce la expresión de la beta defensina humana 2 (HBD-2), la catelicidina LL-37 e Interleucina- 8 (IL-8), en neumocitos humanos tipo 2 (A549) y monocitos derivados a macrófagos.
- Determinar el tiempo de estimulación a la cual se da una mayor expresión de HBD-2, LL-37 e IL-8
- Determinar la concentración de L-Isoleucina a la cual se observa una mayor expresión de HBD-2, LL-37 e IL-8.

MATERIAL Y MÉTODOS.

- **Células de Epitelio Alveolar:** La línea celular A549, perteneciente a neumocitos alveolares humanos tipo II (A549, *American Type Culture Collection* número de referencia CCL185) fue cultivada en botellas de 75 cm² (Costar. Ontario Canadá) con RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY) suplementado con glutamina, gentamicina y 10% de suero fetal bovino (FCS, Hyclone laboratorios, Logan, Utah), fue incubada a 37°C con 5% de CO₂ y se dejó crecer hasta semiconfluencia. Las células A549 fueron colocadas en placas de 24 pozos (Costar. Ontario Canadá) a una concentración de 10⁵ células por mL y se dejaron 24 h a 37°C y 5% CO₂ hasta la estimulación con L-Isoleucina.
- **Obtención de monocitos y desarrollo a macrófagos:** Se obtuvieron muestras sanguíneas de pacientes entre 19 -21 años, los cuales no presentaban síntomas clínicos ni radiográficos de tuberculosis pulmonar, no presentaban diabetes y su prueba de VIH era negativa. Las muestras se obtuvieron por punción intravenosa, obteniéndose 180 mL de cada paciente. Se separaron los monocitos por medio de la técnica de Ficoll Hypaque (Sigma-Aldrich), los monocitos obtenidos se colocaron en placas de 24 pozos a una concentración de 10⁵ células por pozo, los cuales contenían medio de cultivo RPMI 1640 enriquecido con 1% de suero fetal bovino, glutamina y 0.5 mL/L de gentamicina. Se mantuvieron los monocitos durante 7 días, cambiando el medio cada 3 días. Al séptimo día se pudo observar que estos monocitos ya se habían

desarrollado a macrófagos gracias a la morfología que estos presentaban.

- **Estimulación celular:** El medio de cultivo fue removido cuidadosamente y las células fueron lavadas 3 veces con solución salina y se colocó 1 mL de medio F10 (Sigma-Aldrich) con 1% de suero fetal bovino, gentamicina y glutamina. La L-Isoleucina fue diluida con agua estéril, obteniendo una concentración final de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$, con esta dilución se estimularon las células usando diferentes concentraciones las cuales son; $3\mu\text{g}$, $7\mu\text{g}$, $12\mu\text{g}$, $25\mu\text{g}$, $50\mu\text{g}$, y $100\mu\text{g}$. Las células fueron entonces incubadas a 37°C con 5% CO_2 por 1, 6, 12 y 18 horas y entonces fueron lisadas con $350\mu\text{L}$ de buffer RLT1 (Qiagen) por cada 10^5 células.
- **Extracción de RNA:** El RNA fue extraído utilizando el kit comercial de Qiagen: RNeasy, siguiendo las instrucciones del proveedor. Las células, fueron lisadas por la adición de $350\mu\text{L}$ de Buffer RLT, a esta mezcla se le adicionó $350\mu\text{L}$ etanol al 70%, se mezclaron en vortex y se colocó en la columna de separación, la cual se colocó en un tubo de 2 mL y se centrifugó 5 min. a 14000 rpm a 4°C . Se eliminó el sobrenadante y se le adicionó $700\mu\text{L}$ de buffer RW1 y se volvió a centrifugar la columna 14000rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminó y se adicionó a la columna $500\mu\text{L}$ de buffer RPE y se volvió a centrifugar la columna bajo las mismas condiciones, se eliminó el sobrenadante y la columna se transfirió a un tubo nuevo. Se adicionó $50\mu\text{L}$ de agua libre de RNasas a la columna y se centrifugó, bajo las mismas condiciones. Se recolectó el sobrenadante y se guardó en refrigeración.

- **Trascricpción inversa y síntesis de cDNA:** El mRNA fue transcrito inversamente utilizando el kit Omniscript Reverse transcription de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA fue mezclado con una mezcla de reacción la cual contenía 10X buffer RT, Mezcla de dNTPs (5 mM de cada trifosfato desoxybucleotido), 10 µM del primer Oligo-dT 10 unidades/µL de Inhibidor de RNasas, Transcriptasa inversa Omniscript y Agua libre de RNasa. La mezcla final fue sintetizada en un termociclador marca Biorad, utilizando un ciclo de 95°C por 15 minutos y 37°C por 50 minutos, transcurrido este ciclo, la mezcla fue recolectada y puesta en refrigeración. La concentración del cDNA fue medido por espectrofotometría, leyéndose cada muestra a una longitud de onda de 280 y para descartar contaminación a una longitud de onda de 260.
- **PCR:** Los primers utilizados para fragmentos genéticos de 102pb para HBD-2 fueron; 5'- CAT CAG CCA TGA GGG TCT-3'(forward) y 5'- AGG CAG GTA ACA GGA TCG-3'(reverse), los primers utilizados para LL-37 fueron: 5'-GAA GAC CCA AAG GAA TGG CC-3' y 5'CAG AGC CCA GAA GCC TGA GC-5' y los primers utilizados para IL-8 fueron: 5'- ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT-3' y 5'- TTA TGA ATT CTC AGC CCT CTT CAA-3'. Un microgramo de cDNA fue agregado a la mezcla de reacción, la cual contenía; Buffer 10x PCR, MgCl₂ (10mM), trifosfato desoxynucleotido (25mM), 1 unidad e Taq polimerasa y los primers respectivos para cada caso. Y la amplificación se llevó a cabo con los siguientes ciclos, para HBD-2; 36 ciclos (95 °C por 45 segundos, 59 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto). y 72°C por 10 minutos. Para

LL-37; 36 ciclos (95 °C por 45 segundos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto). y 72°C por 10 minutos. Y para IL-8; 36 ciclos (95 °C por 45 segundos, 58 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto). y 72°C por 10 minutos. La electroforesis de los diferentes productos amplificados fue realizada en geles de agarosa, en diferentes concentraciones; 3% de agarosa para los productos de HBD-2 y 1.8% para IL-8 y LL-37. Y fueron revelados con SYBR green (Qiagen). Todos los primers fueron diseñados utilizando el programa Primer Express, el cual fue proporcionado por Applied biosystems y fueron sintetizados por Invitrogen.

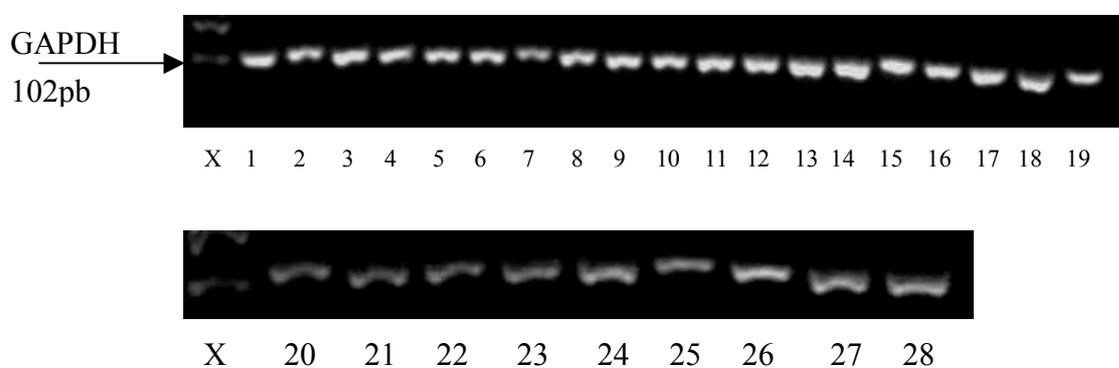
- **PCR tiempo Real:** Los primers utilizados para la amplificación de un producto de 102 pb para HBD-2 fueron; 5'- CAT CAG CCA TGA GGG TCT-3'(forward) y 5'- AGG CAG GTA ACA GGA TCG-3'(reverse), los primers utilizados para LL-37 fueron: 5'-GAA GAC CCA AAG GAA TGG CC-3' y 5'-CAG AGC CCA GAA GCC TGA GC-5'. Y los primers utilizados para IL-8 fueron 5'-AGA AAC CAC CGG AAG GAA CC - 3'(forward) y 5'- CAC CTT CAC GAG CTG CAG-3'(reverse). Un microlitro de cDNA fue agregado a la mezcla de reacción del kit comercial Quantitect SYBR Green PCR de Qiagen, la cual contenía; SYBR green, Buffer PCR Master Mix, agua y los primers respectivos para cada caso. Se realizó la amplificación en un termociclador para tiempo real modelo 7500 de Applied biosystem, con los siguientes ciclos HBD-2 e IL-8; 1 ciclo (95°C por 10 min.) y 40 ciclos (95°C por 20seg., 59°C por 20 segundos y 72°C por 34 segundos) y para LL-37: 1 ciclo

(95°C por 10 min.) y 40 ciclos (95°C por 20seg., 60°C por 20 segundos y 72°C por 34 segundos). Todos los primers fueron diseñados utilizando el programa Primer Express, el cual fue proporcionado por Applied biosystems y fueron sintetizados por Invitrogen.

RESULTADOS:

Determinación de catelicidina humana (LL-37), Interleucina-8 (IL) y β -defensinas-2 humana (HBD-2), en monocitos humanos derivados a macrófagos por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

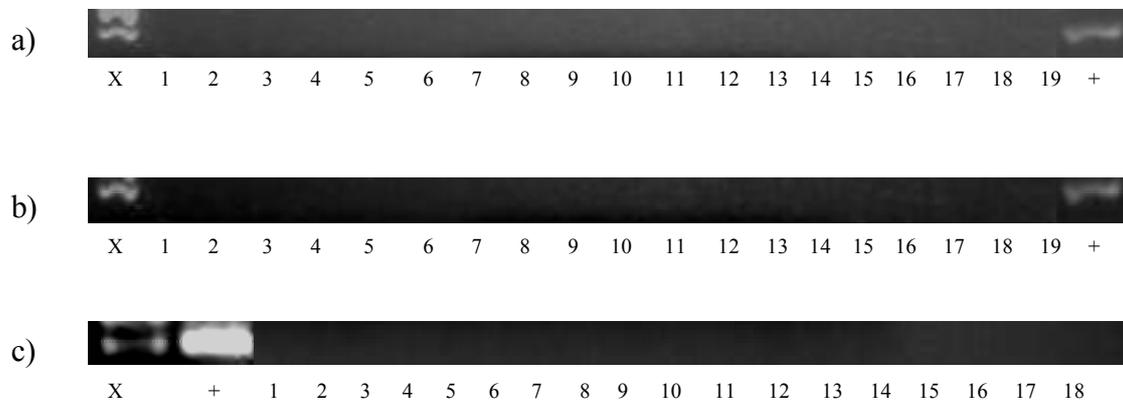
Ya extraído el material genético de los cultivos de monocitos derivados a macrófagos previamente estimulados con L-Isoleucina, se procedió a hacer PCR convencional para Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, esto para verificar la integridad del cDNA obtenido.



X= marcador	10 = 7 μ g, 6h.	20 = 50 μ g, 12h.
1 = none, 1h.	11 = 12 μ g, 6h.	21 = 100 μ g, 12h
2 = 3 μ g, 1h.	12 = 25 μ g, 6h.	22 = none, 18h.
3 = 7 μ g, 1h.	13 = 50 μ g, 6h.	23 = 3 μ g, 18h
4 = 12 μ g, 1h.	14 = 100 μ g, 6h.	24 = 7 μ g, 18h.
5 = 25 μ g, 1h.	15 = none, 12h.	25 = 12 μ g, 18h.
6 = 50 μ g, 1h.	16 = 3 μ g, 12h	26 = 25 μ g, 18h.
7 = 100 μ g, 1h.	17 = 7 μ g, 12h.	27 = 50 μ g, 18h.
8 = none, 6h.	18 = 12 μ g, 12h.	28 = 100 μ g, 18h
9 = 3 μ g, 6h	19 = 25 μ g, 12h.	

Fig. 2. Se observa la amplificación del producto de 102 pb para GAPDH en las muestras de monocitos desarrollados a macrófagos.

Teniendo la certeza de que el cDNA se encontraba en buen estado se procedió a realizar los PCR convencionales para LL-37, IL-8 y HBD-2, obteniéndose los siguientes resultados:



X= marcador

1 = none, 1h.

2 = 3µg, 1h.

3 = 7µg, 1h.

4 = 12µg, 1h.

5 = 25µg, 1h.

6 = 50µg, 1h.

7 = 100µg, 1h.

8 = none, 6h.

9 = 3µg, 6h

10 = 7µg, 6h.

11 = 12µg, 6h.

12 = 25µg, 6h.

13 = 50µg, 6h.

14 = 100µg, 6h.

15 = none, 12h.

16 = 3µg, 12h

17 = 7µg, 12h.

18 = 12µg, 12h.

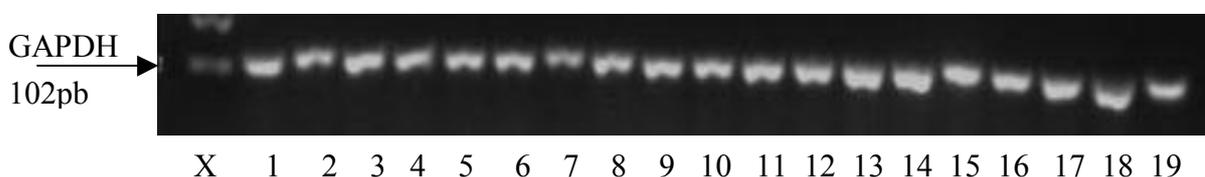
19 = 25µg, 12h.

+ = control positivo

Fig. 3. Se muestra que no se obtuvieron amplificaciones para: a) LL-37, b) HBD-2 y c) IL-8 en monocitos desarrollados a macrófagos, utilizando como control positivo, neumocitos infectados con *M. tuberculosis*.

Determinación de catelicidina humana (LL-37), Interleucina-8 (IL) y β -defensinas-2 human a (HBD-2), en neumocitos humanos tipo II por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

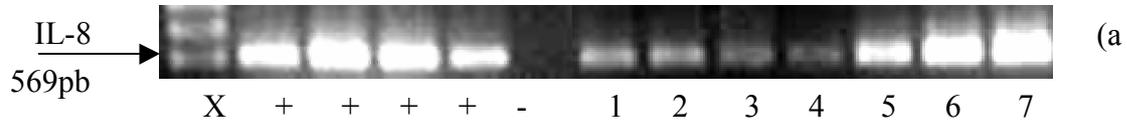
Una vez extraído el material genético de los cultivos celulares estimulados con L-isoleucina, se procedió a realizar los PCR convencionales correspondientes para, LL-37, IL-8 y β -defensinas-2 humana. Para verificar la integridad del cDNA se utilizó el gen Gliceraldehído 3 fosfato dehidrogenasa (GAPDH), obteniéndose:



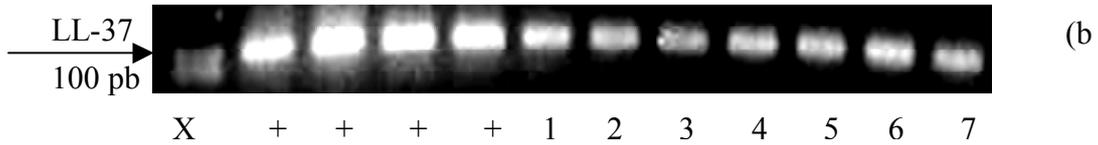
X= marcador	10 = 7 μ g, 6h.	20 = 50 μ g, 12h.
1 = none, 1h.	11 = 12 μ g, 6h.	21 = 100 μ g, 12h
2 = 3 μ g, 1h.	12 = 25 μ g, 6h.	22 = none, 18h.
3 = 7 μ g, 1h.	13 = 50 μ g, 6h.	23 = 3 μ g, 18h
4 = 12 μ g, 1h.	14 = 100 μ g, 6h.	24 = 7 μ g, 18h.
5 = 25 μ g, 1h.	15 = none, 12h.	25 = 12 μ g, 18h.
6 = 50 μ g, 1h.	16 = 3 μ g, 12h	26 = 25 μ g, 18h.
7 = 100 μ g, 1h.	17 = 7 μ g, 12h.	27 = 50 μ g, 18h.
8 = none, 6h.	18 = 12 μ g, 12h.	28 = 100 μ g, 18h
9 = 3 μ g, 6h	19 = 25 μ g, 12h.	

Fig. 4. En la figura se observa el producto de amplificación de 102pb para GAPDH en neumocitos humanos estimulados con L-Ile.

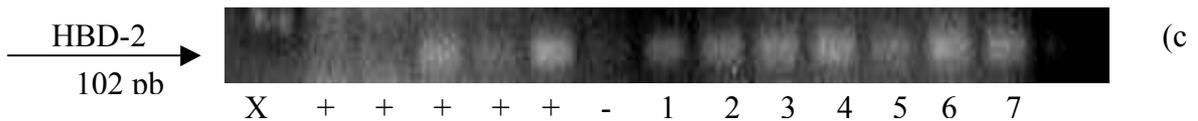
Ya comprobado que el cDNA se encontraba en buenas condiciones se procedió a realizar los PCR para las moléculas en estudio.



X = Marcador
 + = Control positivo
 - = Control negativo
 1 = none
 2 = 3 $\mu\text{g/mL}$
 3 = 7 $\mu\text{g/mL}$
 4 = 12 $\mu\text{g/mL}$
 5 = 25 $\mu\text{g/mL}$
 6 = 50 $\mu\text{g/mL}$
 7 = 100 $\mu\text{g/mL}$



X = Marcador
 + = Control positivo
 1 = none
 2 = 3 $\mu\text{g/mL}$
 3 = 7 $\mu\text{g/mL}$
 4 = 12 $\mu\text{g/mL}$
 5 = 25 $\mu\text{g/mL}$
 6 = 50 $\mu\text{g/mL}$
 7 = 100 $\mu\text{g/mL}$



X = Marcador
 + = Control positivo (Cel. Infectadas con Mtb 10:1)
 1 = none
 2 = 3 $\mu\text{g/mL}$
 3 = 7 $\mu\text{g/mL}$
 4 = 12 $\mu\text{g/mL}$
 5 = 25 $\mu\text{g/mL}$
 6 = 50 $\mu\text{g/mL}$
 7 = 100 $\mu\text{g/mL}$

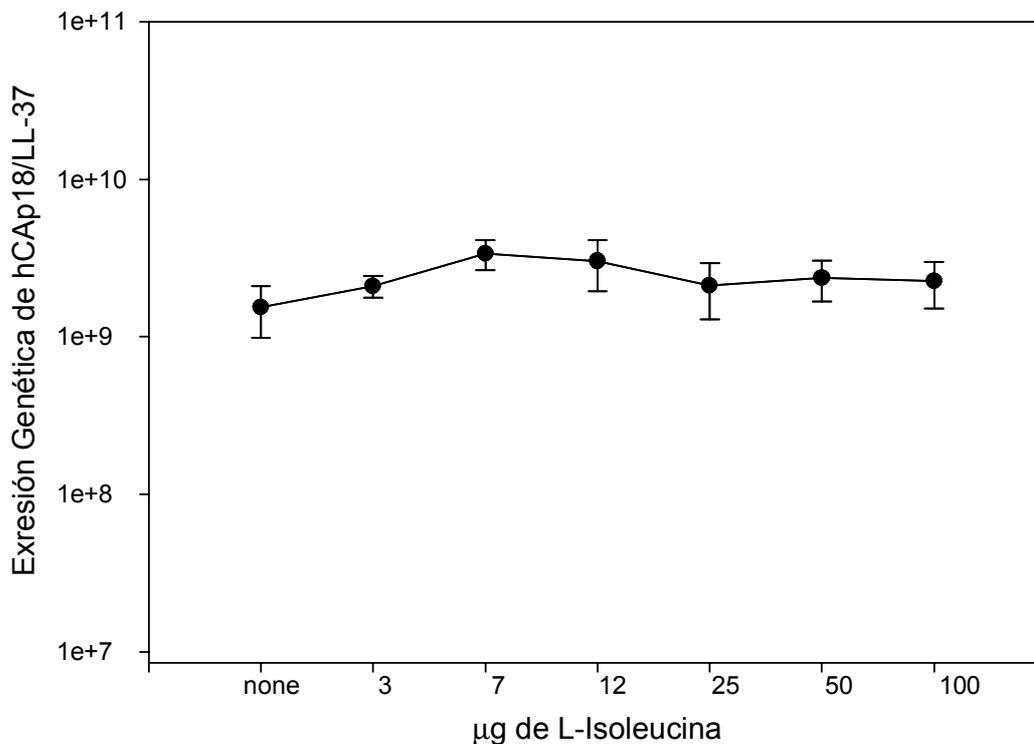
Fig.5. a) Se observa la amplificación obtenida para IL-8 con un producto de 596 pb, b) Amplificación obtenida para LL-37 con un producto de 100 pb y c) Amplificación para HBD-2 con un producto de 102 pb. En todos los casos se utilizó como control positivo, células epiteliales infectadas con *M. tuberculosis*

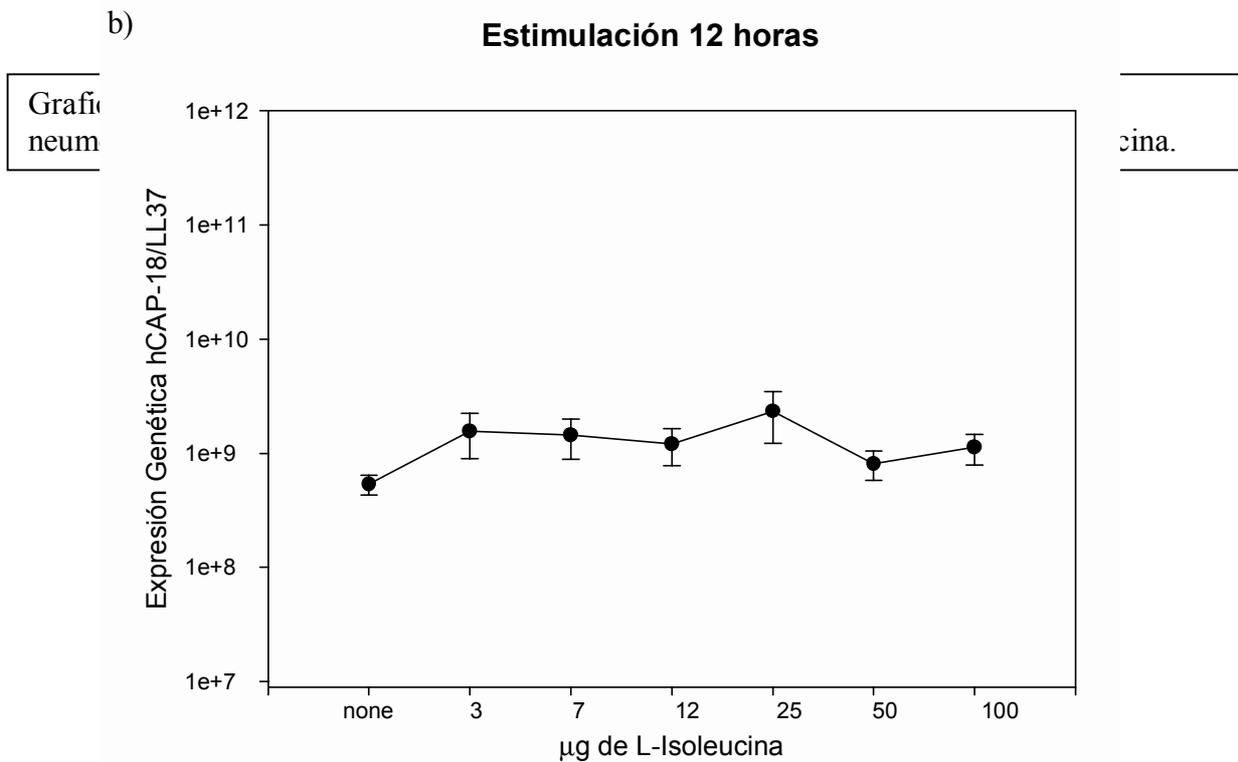
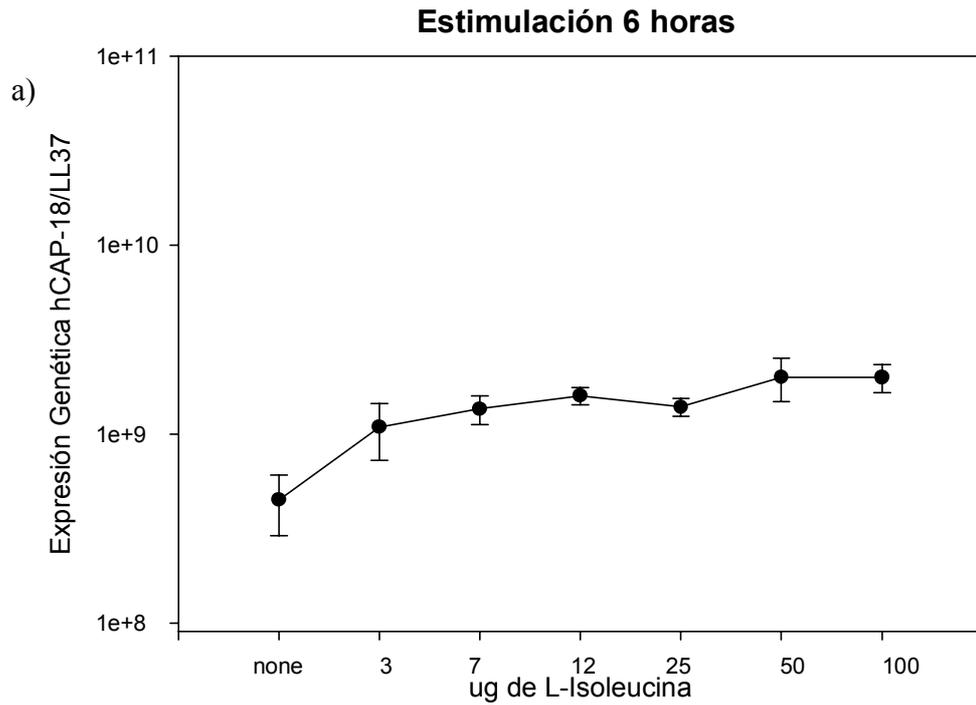
Determinación de; catelicidina humana (LL-37), Interleucina-8 (IL) y β -defensinas-2 humana (HBD-2) por Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo real (qPCR).

Al observarse por PCR convencional que existía expresión de estas moléculas, se procedió a realizar qPCR para determinar cuantitativamente la producción de estas moléculas.

Los resultados obtenidos para LL-37 fueron los siguientes:

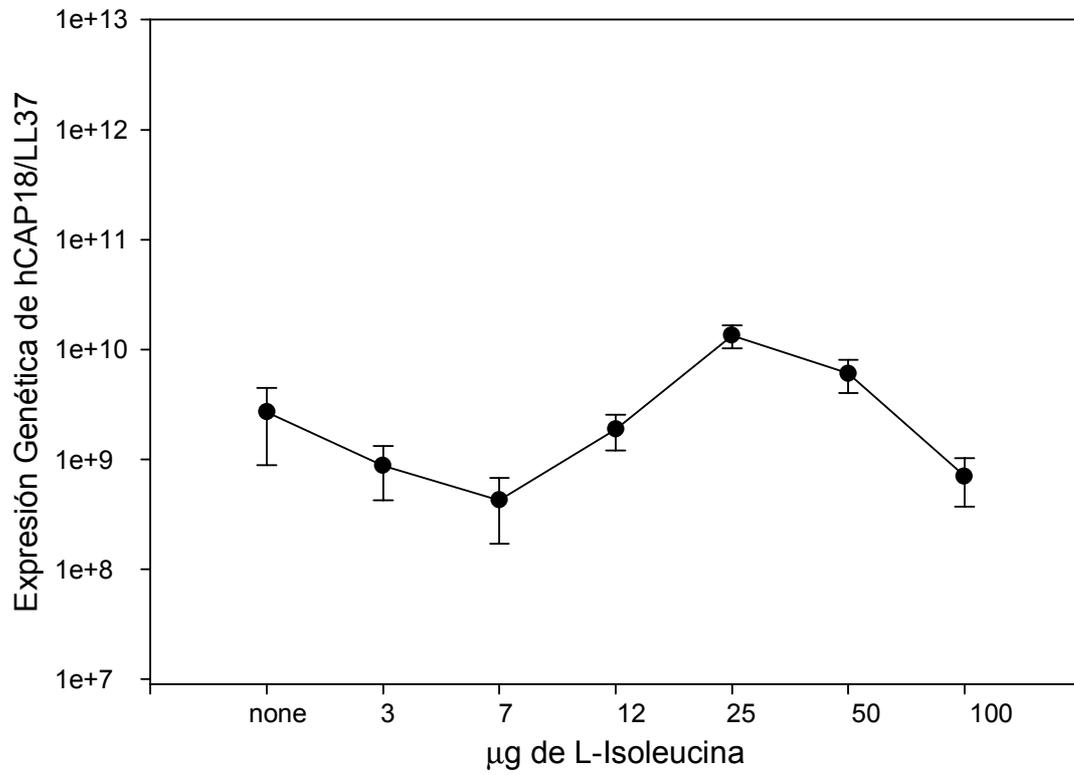
Estimulo por 1 hora.





Grafica 2 a) Expresión genética de hCAP-18/LL37 en neumocitos alveolares después de ser estimulados por 6 horas con diferentes cantidades de L-Isoleucina. b) Expresión genética de hCAP-18/LL37 en neumocitos al ser estimulados por 12 horas con diferentes cantidades de L-Isoleucina.

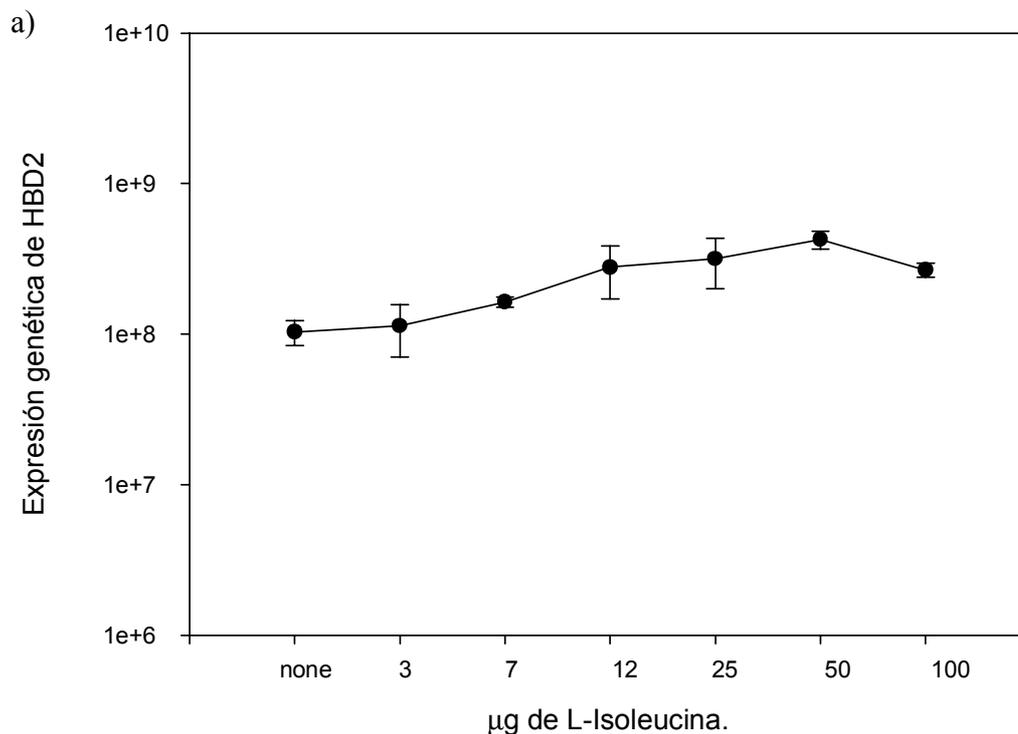
Estimulación 18 horas



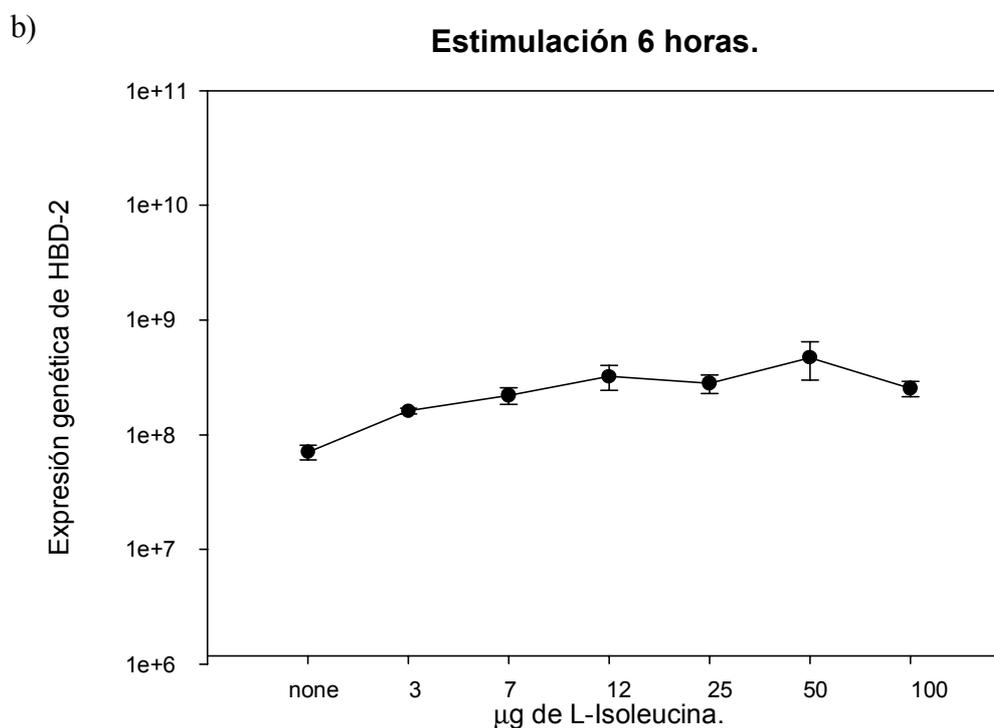
Gráfica 3 Expresión genética obtenida para hCAP-18/LL37 en neutrocitos después de ser estimulados por 18 horas con diferentes cantidades de L-Isoleucina.

Los resultados obtenidos para HBD-2 fueron los siguientes:

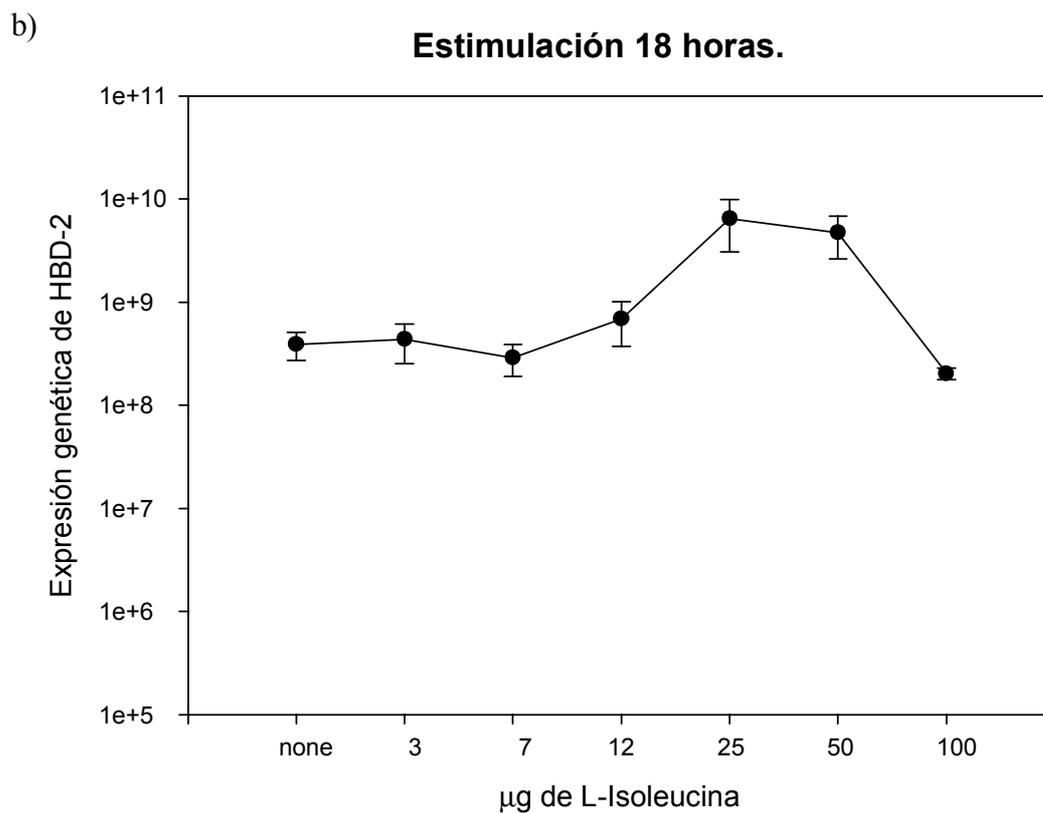
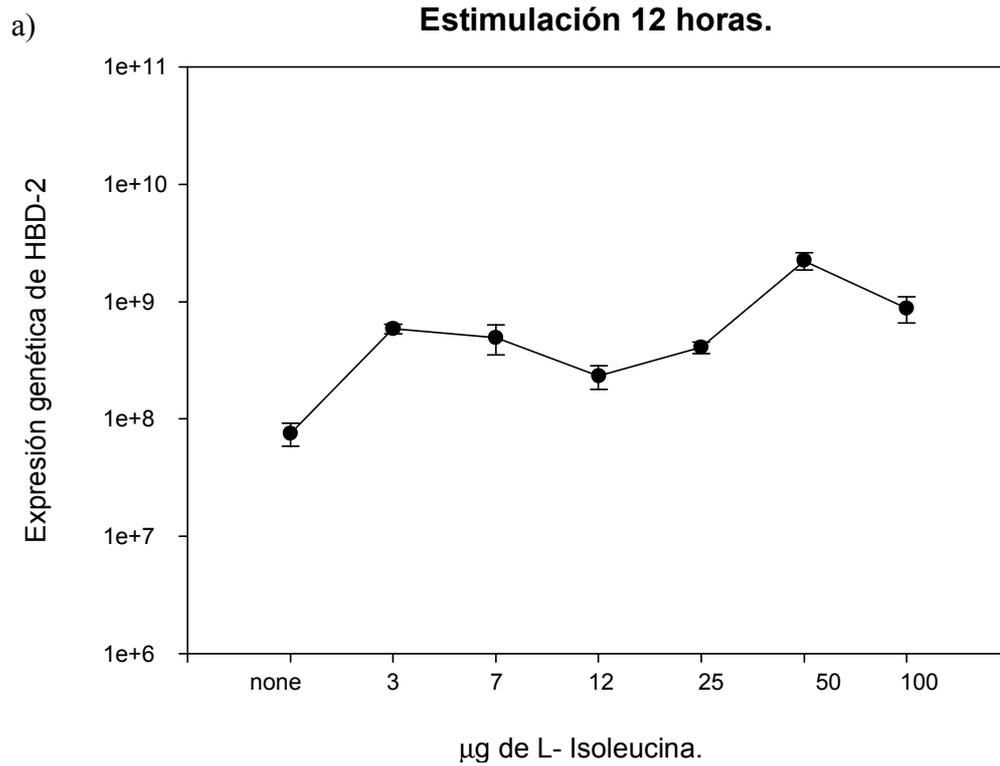
Estimulación 1 hora.



Estimulación 6 horas.



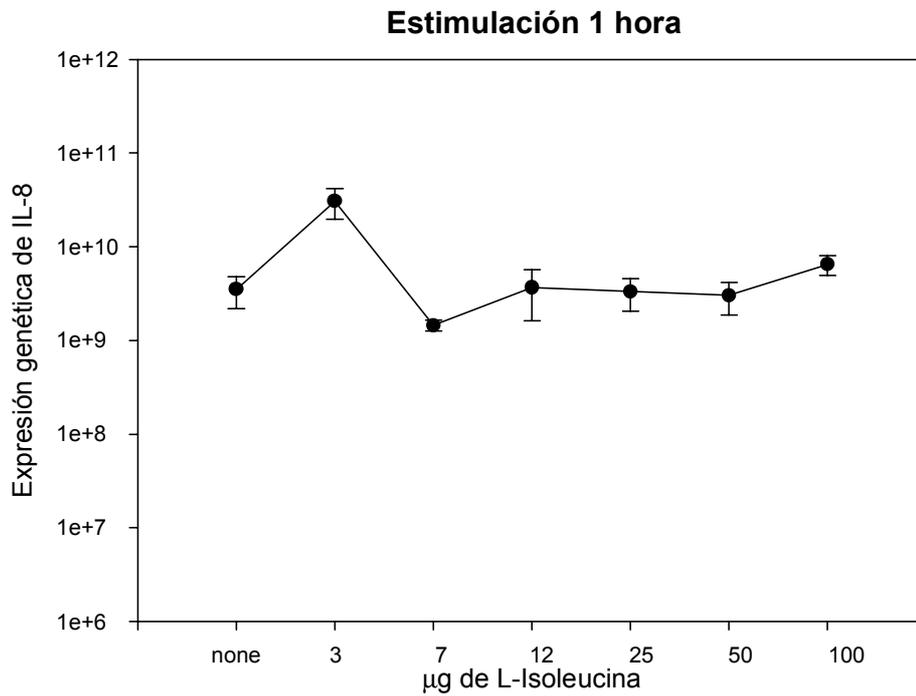
Gráfica 4 a) Expresión genética de HBD-2 en neumocitos después de ser estimulados por 1 hora con diferentes concentraciones de L-Isoleucina. b) Expresión genética de HBD-2 en neumocitos después de ser estimulados por 6 horas con diferentes concentraciones de L-Isoleucina



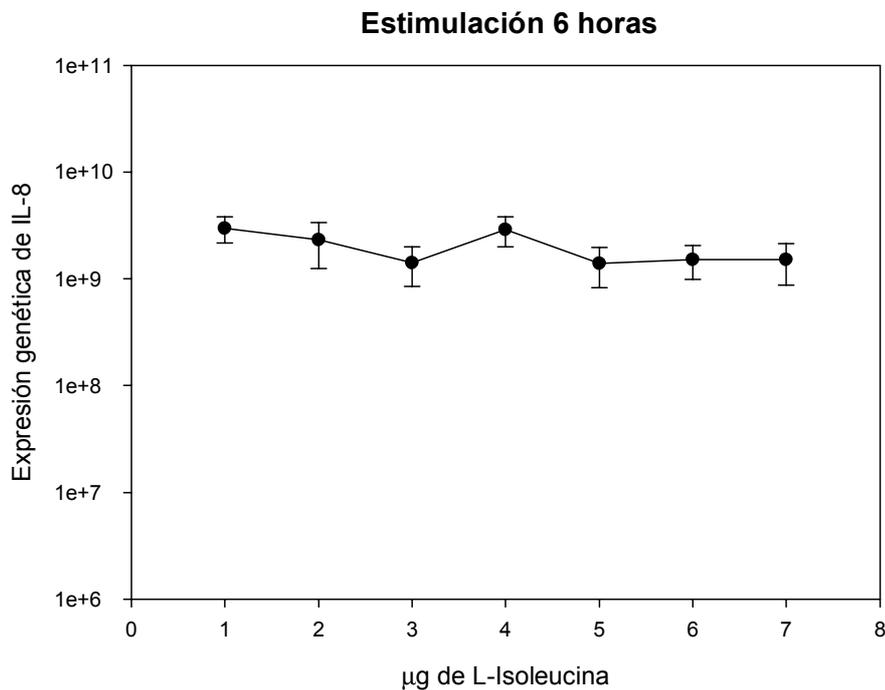
Grafica 5. a) Expresión genética de HBD-2 en neumocitos después de ser estimulados por 12 horas con diferentes concentraciones de L-Isoleucina. b) Expresión genética de HBD-2 en neumocitos después de ser estimulados por 18 horas con diferentes concentraciones de L-Isoleucina

Los resultados obtenidos para IL-8 son los siguientes:

a)



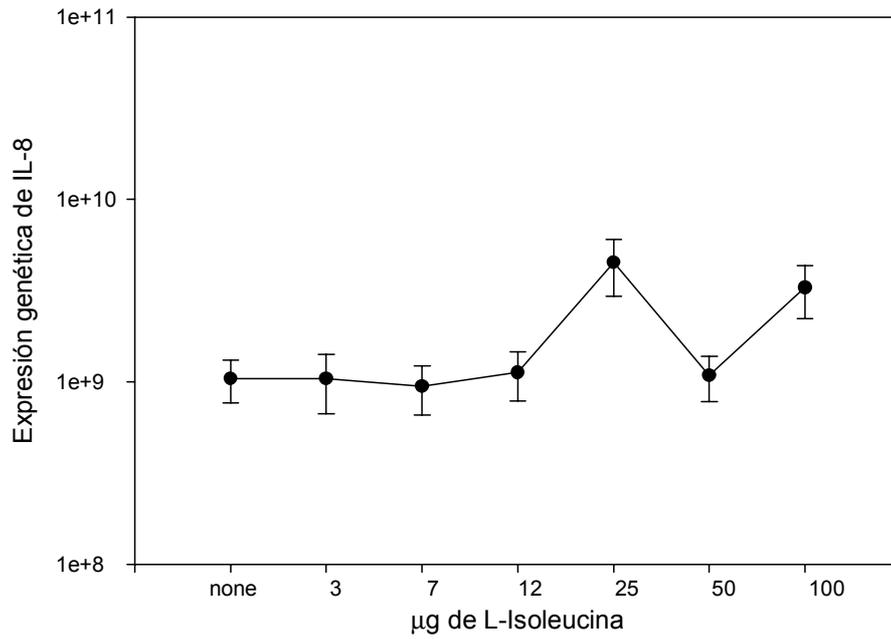
b)



Grafica 6. a) Expresión genética de IL-8 en neumocitos después de ser estimulados por 1 hora con diferentes concentraciones de L-Isoleucina. b) Expresión genética de IL-8 en neumocitos después de ser estimulados por 6 horas con diferentes concentraciones de L-Isoleucina

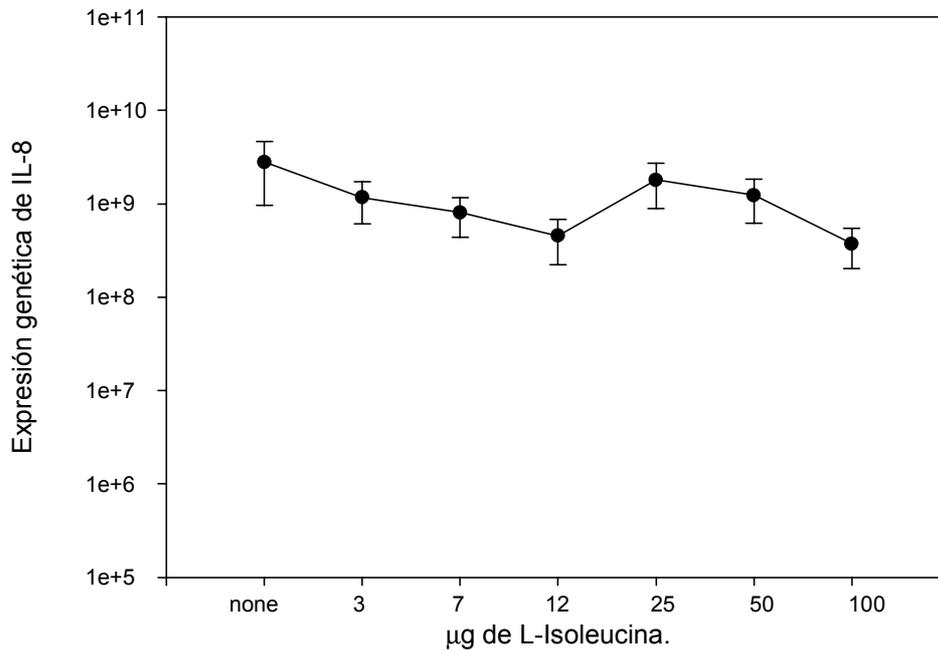
a)

Estimulación 12 horas



b)

Estimulación 18 horas.



Grafica 7. a) Expresión genética de HBD-2 en neumocitos después de ser estimulados por 12 horas con diferentes concentraciones de L-Isoleucina. b) Expresión genética de HBD-2 en neumocitos después de ser estimulados por 18 horas con diferentes concentraciones de L-Isoleucina

DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

La inmunidad innata es la primera línea de defensa en contra de microorganismos, además ayuda a iniciar la respuesta inmune específica. Los péptidos antimicrobianos como lo son las defensinas y las catelicidinas forman parte de estos péptidos antimicrobianos y son parte de la respuesta inmune innata, estos péptidos actúan directamente en contra de los microorganismos además de tener un efecto inmunomodulador[12]. Al igual que los péptidos antimicrobianos, la interleucina-8 también juega un papel muy importante en la respuesta inmune ya que ésta al ser secretada, tiene una actividad quimiotáctica muy importante sobre macrófagos[16, 18].

La catelicidina LL-37 ha demostrado ser muy importante en el control de algunas enfermedades, como lo es la *Shigellosis*, esto se puede observar en el trabajo realizado por Raqib y colaboradores, en el cual demostraron que al incrementarse la producción de LL-37 a través de butirato de sodio se controlaba de mejor manera la *Shigellosis*[38]. Anexando a esto, se ha demostrado también que LL-37 tiene un efecto quimiotáctico sobre: monocitos, linfocitos T y neutrófilos[6, 26]. Los datos obtenidos en este experimento sugieren que la L-Isoleucina es un buen inductor de este péptido antimicrobiano en células epiteliales de pulmón a la concentración de 25 µg a las 18 horas de estimulación, sin embargo se puede observar incremento en la expresión genética desde la 6 horas de estimulación aunque esta expresión no es tan significativa como la mostrada a las 18 horas.

En los últimos años se ha observado que las HBD-2, las cuales son secretadas principalmente en epitelio pulmonar, tienen un papel muy importante en el control de enfermedades[26, 39]. Esto se ha demostrado ya

que en algunas enfermedades como la fibrosis quística en la cual existe una alta concentración de sales se ve inhibida la producción de HBD-2, lo cual está asociado con infecciones bacterianas en pulmón[40]. Otra enfermedad la cual se ha estudiado debido a su relación con las HBD-2 es la tuberculosis. En el 2001 Sharma y colaboradores observaron *in vitro* que *Mycobacterium tuberculosis* disminuye su crecimiento dentro de los macrófagos en presencia de las HBD-2, y que la mortalidad de la bacteria incrementaba, cuando se aumentaba la concentración de HBD-2[28]. Otros estudios realizados en el 2005 en donde Rivas-Santiago y colaboradores, encontraron que la *Mycobacterium tuberculosis* cepa HRv 37, estimulan en células epiteliales de pulmón la producción de HBD-2[35]. Un año más tarde este mismo grupo reportó que las HBD-2 tienen un papel muy importante en el control de la tuberculosis, ellos observaron en ratones que: durante la infección latente la producción de HBD-2 es constante, mientras que durante la infección progresiva existe una disminución en la producción de HBD-2, pero si a los ratones los cuales tienen infección latente se les da un inmunosupresor, las concentraciones de HBD-2 disminuyen y desarrollan la enfermedad[36]. Con estos datos podemos sugerir que las HBD-2 tienen un papel muy importante en el control de la tuberculosis evitando que ésta se desarrolle, de aquí la importancia de encontrar sustancias que sean capaces de estimular su expresión y secreción.

Debido a la importancia que pueden tener las HBD-2 como terapéutico y a los reportes que se tienen, de que la L-Isoleucina tiende a estimular de manera importante la producción de HBD-2 en células epiteliales de riñón bovino[37], se procedió a realizar estímulos con diferentes concentraciones de

L-Isoleucina a células epiteliales de pulmón, obteniéndose que desde la primer hora de estimulación se obtiene expresión genética de HBD-2, aunque en el estímulo en el que es más alto es el incremento de la expresión genética es a las 18 horas con una concentración de 25 μg de L-Isoleucina. Con estos datos se puede pensar que la L-Isoleucina bajo estas condiciones de concentración y tiempo puede ser de gran ayuda durante el tratamiento de enfermedades como lo es la tuberculosis.

La Interleucina-8 (IL-8) es de gran importancia durante la respuesta inmune, ya que esta, tiene un efecto quimiotáctico sobre neutrófilos[16-18]. En el año de 1998 Yuanguang y colaboradores, demostraron que células epiteliales de pulmón al ser infectadas por *M. tuberculosis*, aumenta en forma muy elevada la producción de IL-8[16]. La producción de IL-8 durante la infección con *M. tuberculosis* es muy importante debido a que como ya se ha mencionado esta interleucina tiene poder quimiotáctico sobre neutrófilos, los cuales tienen un papel muy importante durante el control de la tuberculosis ya que, se ha señalado que los neutrófilos, no se asocian directamente a la bacteria sino que estos al llegar al sitio de la infección entran en apoptosis, lo cual produce que los macrófagos infectados por la bacteria, los fagociten[17, 18]. En investigaciones previas se ha llegado a la conclusión de que los neutrófilos al ser fagocitados transfieren las propiedades antimicrobianas presentes en su gránulos al macrófago que lo fagocitó[18]. Es por estos motivos que son de mucha importancia los resultados de esta investigación, por que, estos resultados se demuestra que las células epiteliales al ser estimuladas con L-Isoleucina a una concentración de 3 μg durante 1 hora, se obtendrá la mayor cantidad de IL-8 aunque, al realizar la estimulación a las 12

horas a una concentración de 25 μg se obtiene una diferencia mayor entre las células sin estímulo y las estimuladas bajo estas condiciones, lo cual no sugiere que la mejor condición para utilizar la L-Isoleucina como estimulante de IL-8 es a las condiciones de 12 horas a una concentración de 25 μg .

Los resultados obtenidos en este experimento nos sugieren que la L-Isoleucina *in vitro* es un buen inmunomodulador. En conjunto todos los datos nos sugieren que la concentración de L-Isoleucina a la cual se dará una mayor expresión de estas diferentes moléculas será a los 25 μg , mientras que el tiempo de estimulación es tanto para HBD-2 y LL-37 de 18 horas, pero para IL-8 el tiempo donde mejor estimulación se puede observar es a las 12 horas.

Por lo tanto se puede sugerir que *in vivo* al estimular con L-Isoleucina a enfermos de tuberculosis, podría ser de gran ayuda, ya que, al aumentarse la expresión de HBD-2, la cual por medio de su efecto bactericida ayudaría a controlar la enfermedad, del mismo modo existirían concentraciones mayores de LL-37 lo cual al igual que las HBD-2 ayudarían a controlar la enfermedad por su efecto bactericida, además de que tendría efecto quimiotáctico sobre neutrófilos y linfocitos. Asimismo las células epiteliales al ser estimuladas aumentarían la expresión de IL-8, lo cual produciría la presencia de más neutrófilos los cuales al ser fagocitados por los macrófagos infectados, transferirían la capacidad antimicrobiana que contienen sus gránulos a estos macrófagos.

CONCLUSIONES:

- La L-Isoleucina no estimula la expresión genética de HBD-2, IL-8 y LL-37 en monocitos desarrollados a macrófagos.
- LL-37, HBD-2 e IL-8, son expresadas en mayor cantidad en neumocitos humanos tipo II, después de ser estimuladas con L-Isoleucina.
- La mayor expresión obtenida para LL-37 es con una concentración de 25 μ g de L-Isoleucina después de 18 horas de estimulación
- Para HBD-2 la mayor expresión se dio a un tiempo de estimulación de 18 horas con una concentración de 25 μ g de L-Isoleucina.
- Para IL-8 la mayor cantidad de copias de DNA se da a la primera hora de estimulación con una concentración de 3 μ g de L-Isoleucina, pero en donde existe una mayor diferencia entre las células que no tuvieron estímulo con las que si o tuvieron, fue a las 12 horas de estimulación a una concentración de 25 μ g de L-Isoleucina.

Perspectivas:

- Llevar este experimento a modelo animal, determinar si la L-Isoleucina ayuda al control de la tuberculosis *in vivo* y determinar a qué concentración de L-Isoleucina se da una mejor estimulación de Defensinas y Catelicidinas en el modelo animal.

Referencias Bibliográficas:

1. Shai, Y., *Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1462**(1-2): p. 55-70.
2. Moreno Ramiez, E., et al., [*Study of immunoglobulins, proinflammatory cytokines, lymphoproliferation and phagocytosis in peripheral blood of healthy young people exposed to different levels of atmospheric pollution*]. Rev Alerg Mex, 2006. **53**(1): p. 3-8.
3. Aziz, M.A. and A. Wright, *The World Health Organization/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease Global Project on Surveillance for Anti-Tuberculosis Drug Resistance: a model for other infectious diseases*. Clin Infect Dis, 2005. **41 Suppl 4**: p. S258-62.
4. Lehrer, R.I., A.K. Lichtenstein, and T. Ganz, *Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 105-28.
5. Douvas, G.S., et al., *Gamma interferon activates human macrophages to become tumoricidal and leishmanicidal but enhances replication of macrophage-associated mycobacteria*. Infect Immun, 1985. **50**(1): p. 1-8.
6. Zasloff, M., *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. Nature, 2002. **415**(6870): p. 389-95.
7. Ganz, T. and R.I. Lehrer, *Defensins*. Pharmacol Ther, 1995. **66**(2): p. 191-205.
8. Peloquin, C.A. and S.E. Berning, *Infection caused by Mycobacterium tuberculosis*. Ann Pharmacother, 1994. **28**(1): p. 72-84.
9. Caminero, J.A., *Management of multidrug-resistant tuberculosis and patients in retreatment*. Eur Respir J, 2005. **25**(5): p. 928-36.
10. Raviglione, M.C., D.E. Snider, Jr., and A. Kochi, *Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic*. Jama, 1995. **273**(3): p. 220-6.
11. Daffe, M. and G. Etienne, *The capsule of Mycobacterium tuberculosis and its implications for pathogenicity*. Tuber Lung Dis, 1999. **79**(3): p. 153-69.
12. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immunity*. N Engl J Med, 2000. **343**(5): p. 338-44.
13. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immune recognition: mechanisms and pathways*. Immunol Rev, 2000. **173**: p. 89-97.
14. Rivas-Santiago, B., P. Vieyra-Reyes, and Z. Araujo, [*Cell immunity response in human pulmonary tuberculosis. Review*]. Invest Clin, 2005. **46**(4): p. 391-412.
15. Munk, M.E. and M. Emoto, *Functions of T-cell subsets and cytokines in mycobacterial infections*. Eur Respir J Suppl, 1995. **20**: p. 668s-675s.
16. Lin, Y., M. Zhang, and P.F. Barnes, *Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1998. **66**(3): p. 1121-6.
17. Cox, G., J. Crossley, and Z. Xing, *Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **12**(2): p. 232-7.

18. Tan, B.H., et al., *Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1864-71.
19. Oppenheim, J.J., et al., *Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity*. Ann Rheum Dis, 2003. **62 Suppl 2**: p. ii17-21.
20. Kaiser, V. and G. Diamond, *Expression of mammalian defensin genes*. J Leukoc Biol, 2000. **68**(6): p. 779-84.
21. Wimley, W.C., M.E. Selsted, and S.H. White, *Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores*. Protein Sci, 1994. **3**(9): p. 1362-73.
22. Rooijackers, S.H., K.P. van Kessel, and J.A. van Strijp, *Staphylococcal innate immune evasion*. Trends Microbiol, 2005. **13**(12): p. 596-601.
23. Russell, J.P., et al., *Coordinate induction of two antibiotic genes in tracheal epithelial cells exposed to the inflammatory mediators lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha*. Infect Immun, 1996. **64**(5): p. 1565-8.
24. Boman, H.G., *Peptide antibiotics and their role in innate immunity*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 61-92.
25. Valore, E.V., et al., *Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues*. J Clin Invest, 1998. **101**(8): p. 1633-42.
26. Rivas-Santiago, B., et al., *[Antimicrobial peptides in the innate immunity of infectious diseases]*. Salud Publica Mex, 2006. **48**(1): p. 62-71.
27. Selsted, M.E., et al., *Primary structures of three human neutrophil defensins*. J Clin Invest, 1985. **76**(4): p. 1436-9.
28. Sharma, S., I. Verma, and G.K. Khuller, *Therapeutic potential of human neutrophil peptide 1 against experimental tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(2): p. 639-40.
29. Singh, P.K., et al., *Production of beta-defensins by human airway epithelia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 14961-6.
30. Hiratsuka, T., et al., *Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **249**(3): p. 943-7.
31. Harder, J., et al., *Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic*. J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5707-13.
32. Miyakawa, Y., et al., *In vitro activity of the antimicrobial peptides human and rabbit defensins and porcine leukocyte protegrin against Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1996. **64**(3): p. 926-32.
33. Sharma, S., I. Verma, and G.K. Khuller, *Antibacterial activity of human neutrophil peptide-1 against Mycobacterium tuberculosis H37Rv: in vitro and ex vivo study*. Eur Respir J, 2000. **16**(1): p. 112-7.
34. Kisich, K.O., et al., *Antimycobacterial agent based on mRNA encoding human beta-defensin 2 enables primary macrophages to restrict growth of Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 2001. **69**(4): p. 2692-9.
35. Rivas-Santiago, B., et al., *Human {beta}-defensin 2 is expressed and associated with Mycobacterium tuberculosis during infection of human alveolar epithelial cells*. Infect Immun, 2005. **73**(8): p. 4505-11.

36. Rivas-Santiago, B., et al., *beta -Defensin Gene Expression during the Course of Experimental Tuberculosis Infection*. J Infect Dis, 2006. **194**(5): p. 697-701.
37. Fehlbaum, P., et al., *An essential amino acid induces epithelial beta -defensin expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(23): p. 12723-8.
38. Raqib, R., et al., *Improved outcome in shigellosis associated with butyrate induction of an endogenous peptide antibiotic*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(24): p. 9178-83.
39. Schutte, B.C. and P.B. McCray, Jr., *[beta]-defensins in lung host defense*. Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 709-48.
40. Smith, J.J., et al., *Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid*. Cell, 1996. **85**(2): p. 229-36.