



Defensinas: una nueva perspectiva en antibioticoterapia

Elkin Lemos Luengas, Residente Infectología, María Cristina Sarmiento, Maestría de Infecciones y Salud en el Trópico, Ligia I. Moncada A. Unidad de Parasitología, Departamento de Salud Pública y Tropical Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia.

ABSTRACT

We update the concepts on defensins. Defensins are cationic molecules with microbicidal activities against different microorganisms. Some of them have been described, as constituents in different human tissues while others, as hBD-2, are found only during the infection processes.

RESUMEN

Se hace una actualización del avance en la investigación sobre las defensinas, que son moléculas catiónicas, con poder microbicida variable. Estas moléculas se han dividido en dos familias con base en su composición: las alpha y las beta defensinas. Algunas de estas moléculas se han encontrado como constitutivas en muchos tejidos, y otras como las hBD-2, sólo se encuentran cuando hay un proceso infeccioso.

INTRODUCCIÓN

Desde los orígenes de la hematología y la inmunología modernas, hace ya más de 100 años, se han asociado los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos con la función fagocítica antimicrobiana.

Los neutrófilos y por extensión otras células fagocíticas como los macrófagos y los monocitos, incorporan al agente microbiano y posteriormente lo destruyen

en su interior dentro de las vacuolas fagocíticas. La destrucción per se del microbio se hace por mecanismos oxidativos vinculados a la producción intracelular de otros elementos oxidantes, y por la acción de enzimas y otras sustancias antimicrobianas no oxidativas. Estas sustancias son péptidos o polipéptidos antimicrobianos endógenos que están localizados en los gránulos azurófilos del citoplasma de los polimorfonucleares neutrófilos y que descargan el contenido granular a la vacuola que contiene el germen fagocitado; entre las moléculas antimicrobianas derivadas del gránulo azurófilo del neutrófilo se encuentran el factor incrementante de la permeabilidad y del efecto bactericida, la cathepsina G, la azurocidina y otros polipéptidos entre los que se encuentran las defensinas.

En células de vertebrados, particularmente en el conejo se han encontrado ciertas sustancias intracelulares o endógenas localizadas en el citoplasma de los neutrófilos y de los macrófagos que poseían un poderoso efecto antimicrobiano. Estos polipéptidos no glicosilados identificados como defensinas estaban compuestos por 29 a 34 aminoácidos, eran ricos en arginina con propiedades catiónicas variables, la existencia de estas moléculas no pudo ser demostrada en células humanas por lo cual decayó el interés en ellas. La identificación y aislamiento

de estos compuestos en el hombre en fecha reciente ha renovado de una manera vigorosa el interés en su estudio.

¿Que son las defensinas?

Las defensinas de la mayoría de los mamíferos son péptidos catiónicos compuestos por 24 a 42 residuos de aminoácidos, de los cuales seis son cisteínas, que se disponen en tres puentes disulfuros (1). Las defensinas constituyen entre 5 y 7% de la proteína celular total del neutrófilo y entre 30 y 50 % de la proteína del gránulo azurófilo; en éste se encuentran como precursores y se han denominado prodefensinas 1, 2 y 3.

Las defensinas humanas se han dividido en dos familias, las alfa y las beta-defensinas, con base en el tipo de enlace disulfuro que posean. Dentro de las primeras se encuentran las llamadas defensinas 1, 2, 3 y 4 halladas en los neutrófilos humanos y las HD-5 y HD-6 (HD= human defensins) presentes en las células de Paneth del intestino delgado (2).

Se ha determinado por análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y por microscopía electrónica de transmisión, que únicamente hay dos isoformas de RNAm codificadas para defensinas, estas son expresadas en el intestino delgado del humano y se denominaron HD-

5 y HD-6. La primera está presente en la décimo tercera semana de gestación en el intestino delgado y el colon pero desaparece de esta última localización en la décimo séptima semana. La segunda isoforma es detectada entre las semanas décimo tercera y décimo séptima en el intestino delgado pero no en el colon. (3)

Dentro de la familia de las beta defensinas solamente han sido descritas las hBD-1 y hBD-2 (Human beta defensins). La primera se encuentra principalmente en el epitelio que recubre diferentes órganos, tal es el caso del tracto urogenital, respiratorio, digestivo y en menor grado en leucocitos. La fuente de liberación de esta defensina no es conocida, se han encontrado seis isoformas de hBD-1 que varían en longitud de 37 a 47 aminoácidos y en su actividad bactericida (4).

La hBD-2 se expresa principalmente en el prepucio, pulmones y tráquea y en menor concentración en el riñón, útero, tejidos orales, conjuntiva humana y glándulas salivales (7-9); esta molécula no se expresa en la mucosa del colon normal, pero hay una expresión abundante en el epitelio del colon inflamado (4). En los tejidos orales se encontró, al igual que en el intestino, que la hBD-1 es constitutiva y que la expresión de la hBD-2, es inducida por $\text{IL-1}\beta$ y Lipopolisacáridos (5). Estos mismos hallazgos fueron hechos por Hattenbach y cols en la conjuntiva como respuesta a la infección por microorganismos (6).

Recientemente Tang y cols (7) informaron sobre una defensina encontrada en los leucocitos de *Macacus rhesus* compuesta por 18 aminoácidos que adquiere una estructura cíclica a través de puentes peptídicos, estos autores demostraron que la actividad del péptido en su forma cíclica era tres veces mayor que en su forma lineal. Esta disposición cíclica de las cadenas también ha sido encontrada en las defensinas de invertebrados. Por estudios de resonancia magnética se encontró que las moléculas de defensinas de *Phormia sp.* están compuestas de una α -hélice corta, ligada por dos puentes disulfuro a dos

cadena antiparalelas con un C terminal, y se consideraba que las defensinas de mamíferos y de insectos no eran homólogas (8). Sin embargo, Hughes y cols, en una revisión sobre la diversificación de las defensinas dice que hay suficiente evidencia para pensar que hay una relación más estrecha entre las β -defensinas de los vertebrados con las defensinas de los insectos que entre los dos grupos de defensinas de vertebrados (9).

Se ha reconocido actividad contra una gran variedad de gérmenes incluyendo bacterias, virus, parásitos y hongos. Las defensinas son activas contra las membranas de los microorganismos y tienen una actividad de amplio espectro *in vitro*. El mecanismo de acción de estos péptidos está basado en la capacidad para formar poros en la membrana citoplasmática en los microorganismos.

El blanco de la actividad antimicrobiana de la hBD-1 no ha sido establecido claramente, la hBD-2 ha presentado actividad microbicida *in vitro* contra gérmenes Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros), los hongos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y actividad bacteriostática contra gérmenes gram-positivos como el *Staphylococcus aureus* (10). Además, posee actividad fungistática contra *Histoplasma capsulatum* (11). Se ha establecido *in vitro* que las defensinas bloquean la capacidad de los lipopolisacáridos (LPS) para estimular la producción de factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 6 y otros mediadores de la inflamación, si bien no se sabe aún como se efectúa esa acción de bloqueo (12, 13). Nibbering y cols, (14), plantean que los dos primeros residuos de arginina son importantes en su acción bactericida aún en bacterias resistentes a los antibióticos.

Se ha visto actividad parasiticida de las defensinas contra los trofozoítos de *Giardia lamblia* y *Giardia muris* (15). Otra entidad muy importante en estos tiempos y con el advenimiento del virus de la inmunodeficiencia humana y la pre-

sencia de SIDA en la población es la *cryptosporidiosis*, en esta entidad parasitaria la afectación principal se encuentra en los enterocitos del intestino delgado. Con las nuevas técnicas diagnósticas se ha observado un aumento en la expresión de un nuevo gen (EBD), asociado con la elevación de defensinas en sitios de la mucosa intestinal no afectada por el parásito como respuesta del hospedero a la infección por dicho agente (16).

Sawicki y Mystkowska (17) en un experimento en el que usaron la β -defensina humana 2, para observar su acción *in vitro* en la citotoxicidad para los oocitos de ratón y en la preimplantación de los embriones, encontraron que concentraciones de 50 $\mu\text{g/ml}$ de defensina hBD-2 causaba la muerte del embrión en el estado de dos células. Por lo que plantea la posibilidad de que algunas infertilidades idiopáticas pudieran deberse a estos péptidos antibióticos lo que implicaría que no sólo la inmunidad adaptativa sino también la innata estaría involucrada en estas patologías, al tiempo que plantean una posible utilidad en la contracepción.

De otro lado, se ha sugerido que la inmadurez de las defensas intestinales locales puede contribuir al incremento de la susceptibilidad de los neonatos a las infecciones ocasionadas por flora luminal y el riesgo elevado de enterocolitis necrozante, entidad que causa substancial morbilidad y mortalidad entre infantes prematuros poco común en recién nacidos a término. Estudios realizados demuestran un muy bajo nivel de expresión de las defensinas por el intestino fetal alrededor de las 24 semanas de gestación, que coincide con el límite bajo de viabilidad extrauterina (3).

Se cree que las defensinas tienen un efecto protector contra microorganismos patógenos en pacientes con psoriasis, ya que la incidencia de infecciones cutáneas asociadas es menor de lo esperado, mientras que en extractos de escamas de un paciente que presentaba esta patología se purificaron péptidos antimicrobianos que

actúan contra las bacterias colonizantes (10).

Es así como las defensinas moléculas antiguamente descritas y olvidadas, muestran en la actualidad un papel importante en el control y modulación de la respuesta inmune contra los agentes infecciosos.

En plantas y en insectos se han encontrado unos péptidos cuya actividad es similar a la de las defensinas de vertebrados,

por lo cual se le ha dado el nombre de defensinas, aunque mucho tiempo los investigadores sugirieron que la estructura no era homóloga a las defensinas humanas, en la actualidad ha sido planteado por autores como Hughes (9), que hay evidencia que favorece la opinión de una relación más estrecha entre las β -defensinas humanas y las de los insectos, que entre los dos grupos de defensinas de los vertebrados. Es posible que estas molé-

culas por haber sido exitosas se conservaron durante la historia evolutiva del reino animal, al igual que otras proteínas constitutivas del citoesqueleto.

Todavía existen muchos tópicos por aclarar en cuanto a la acción de estos péptidos, y se piensa en ellos como una esperanza para el tratamiento de aquellas enfermedades derivadas de la infección por microorganismos resistentes a la antibioticoterapia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Bensch KW, Raida M, Mägert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG.** HBD-1 a novel β -defensin from human plasma. *FEBS letters* 1995; 368: 331-335.
2. **Porter EM, Liu L, Oren A, Anton P, and Ganz T.** Localization of human Intestinal Defensin 5 in Paneth Cell Granules. *Infect Immun.* 1997; 65(6): 2389-2395.
3. **Mallow EB, Harris A, Salzman N, Russell JP, DeBerardinis RJ, Ruchelli E.** Bevins ChL. Human Enteric Defensins. *J. Biol. Chem.* 1996; 271(8): 4038-4045.
4. **O'Neil D., Martin Porter E, Eleaut D, Mark Anderson G, Eckman L, Ganz T, Kagnoll MF.** Expression and Regulation of the Human β -Defensins hBD-1 and hBD-2 in Intestinal Epithelium. *J. Immunol.* 1999; 163: 6718-6724.
5. **Mathews M, Jia HP, Guthmiller J, Losh G, Graham S, Johnson GK, Tack BF, McCray B. Jr.** Production of β -Defensin Antimicrobial Peptides by the Oral Mucosa and Salivary Glands. *Infect Immun.* 1999; 67(6): 2740-2745.
6. **Hattenbach L O, Gümbel H, Kippenberger S.** Identification of Beta-Defensins in Human Conjunctiva. *Antimicrob Agents Chemoth.* 1998; 42(12): 3332
7. **Tang Y-Q, Yuan J, Osapay G, Osapay K, Tran D, Miller C, Oullette A J, Selsted ME.** A Cyclic Antimicrobial Peptide Produced in Primate Leukocytes by the Ligation of two Truncated α -defensins. *Science.* 1999; 286: 498-502.
8. **Hetru C, Bulet P, Cociancich S, Dimarcq JL, Hoffman D, Hoffman JA.** Antibacterial Peptides/Polypeptides in the Insect Host Defense: A Comparison with Vertebrate Antibacterial Peptide/Polypeptides. *Phylogenetic Perspectives: En: Hoffman JA, Janeway Ca and Natori JS. Immunity: The Insect Host Defense.* Eds. Boca Ratón CRC Press. 1994: 43-66
9. **Hughes AL** Evolutionary diversification of mammalian defensins. *Cell Mol Life Sci.* 1999; 56(1-2): 94-103.
10. **Bartels JHJ, Christophers E, Schröder A.** A peptide antibiotic from human skin. *Nature.* 1997; 387: 861
11. **Newman SL, Gootee L, Gabay JE, and Selsted ME.** Identification of Constituents of Human Neutrophil Azurophil Granules that Mediate Fungistasis against *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun.* 2000; 68(10): 5668-5672.
12. **Scott M, Rosenberger CM, Gold MR, Finlay BB, Hancock. REW.** An α -Helical Cationic Antimicrobial Peptide Selectively Modulates Macrophage Responses to Lipopolysaccharide and Directly Alters Macrophage Gene. *J. Immunol.* 2000; 165: 3358-3365.
13. **Scott M, Vreugdenhil A, Buurman W, Hancock R, Gold M.** Cutting edge Cationic Antimicrobial Peptides Block the Binding of Lipopolysaccharide (LPS) to LPS Binding Protein. *J. Immunol.* 2000; 164:549-553.
14. **Nibbering PH, Ravensbergen E, Welling MM, Van Berkel LA, Van Verkel PHC, Pauwels EKJ and Nuijens JH.** Human Lactoferrin and Peptides Derived from its N Terminus are Highly Effective against Infections with Antibiotic-Resistant Bacteria. *Infect Immun.* 2001; 69(3):1469-1476
15. **Aley SB, Zimmerman M, Hetsko M, Selsted ME, and Gillin FD.** Killing of *Giardia lamblia* by cryptidins and cationic neutrophil peptides. *Infect. Immun.* 1994; 62 (12): 5397-5403.
16. **Tarver AP, Clark DP, Diamond G, Russell JP, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Cohen et al.** Enteric β -Defensin; Molecular Cloning and Characterization of a Gene with Inducible Intestinal Epithelial Cell Expression Associated with *Cryptosporidium parvum* Infection. *Infect Immun.* 1998; 66(3): 1045-1056.
17. **Sawicki W, Mystkowska ET.** Contraceptive Potential of Peptide Antibiotics. *Lancet.* 1999; 353: 464-465.

AGRADECIMIENTOS

Los autores queremos agradecer a los doctores Augusto Corredor A. y Carlos Alvarez M, por los comentarios y sugerencias hechas al manuscrito, a los demás compañeros de la Unidad de Parasitología.