

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

“Inducción de péptidos antimicrobianos en epitelio de vías respiratorias”

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA.

ALUMNO:

EDUARDO GUANÍ GUERRA

TUTORES:

DR. LUIS MANUEL TERÁN JUÁREZ

DR. JUAN ASBUN BOJALIL

Abril del 2011



SP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 8:00 horas del día 14 del mes de Abril del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M. para examinar la tesis titulada:

“Inducción de péptidos antimicrobianos en epitelio de vías respiratorias”

Presentada por el alumno:

Guaní	Guerra	Eduardo
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)

Con registro:

B	0	7	1	5	3	0
----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

aspirante de:

Doctorado en Investigación en Medicina

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

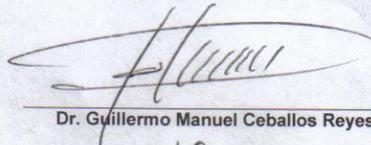
Directores de tesis



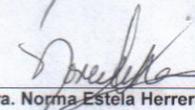
Dr. Juan Asbun Bojalil



Dr. Luis Manuel Terán Juárez



Dr. Guillermo Manuel Ceballos Reyes

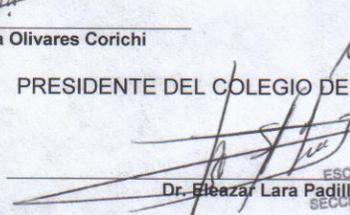


Dra. Norma Estela Herrera González



Dra. Ivonne María Olivares Corichi

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



Dr. Eleazar Lara Padilla


ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
IPN
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN
Y CONTROL ESCOLAR



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 14 del mes Abril del año 2011, el que suscribe Guaní Guerra Eduardo alumno del Programa de Doctorado en Investigación en Medicina con número de registro B071530, adscrito a la Escuela Superior de Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Juan Asbun Bojalil, Dr. Luis Manuel Terán Juárez y cede los derechos del trabajo intitulado Inducción de péptidos antimicrobianos en epitelio de vías respiratorias, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección eduardoguani@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Eduardo Guaní Guerra

Nombre y firma

Lugar de realización:

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Ismael Cosío Villegas (INER).

Investigadores asociados:

Aurea Rosalía Montes Vizuet *
Cristina Negrete*

* Químico Farmacobiólogo, departamento de investigación en inmunogenética del INER.

AGRADECIMIENTOS

A TI, A LA VIDA

A mis padres, por haberme dado la vida;

A mis hermanos, por compartir mi sangre y ser mis aliados en la vida;

A mis amigos, por enseñarme a disfrutar y compartir la alegría de la vida;

A mi esposa, por comprenderme y ser mi compañera en la vida;

A mi hija Dariana por ser luz y permitirme continuar a través de ella la vida,

A mí, por permitirme soñar en la vida;

A ti mi guía, mi maestro, mi Dios; por crear a mis padres, a mis hermanos,

a mis amigos, a mi esposa, a mi hija, a los sueños, a la vida.....

INDICE

I.	Título	8
II.	Resumen	9
III.	Abstract	10
IV.	Marco Teórico	11
V.	Justificación	31
VI.	Planteamiento del problema	32
VII.	Hipótesis	33
VIII.	Objetivos	34
IX.	Estudio 1. Descripción, material y métodos	35
X.	Estudio 2. Descripción, material y métodos	42
XI.	Estudio 3. Descripción, material y métodos	53
XII.	Resultados	59
XIII.	Discusión	73
XIV.	Conclusiones	84
XV.	Referencias	85
XVI.	Anexos	100
XVII.	Glosario	118
XIII.	Abreviaturas	121

INDICE DE CUADROS

Cuadro A	Clasificación de los péptidos antimicrobianos.	14
Cuadro B	Características de los principales péptidos antimicrobianos en humanos.	19
Cuadro 1	Detección de hBD-2 y LL-37 en el sobrenadante del cultivo de células A-549, sometido a distintos estímulos durante 24 y 48h.	60
Cuadro 2	Características generales de los pacientes de estudio 2.	63
Cuadro 3	Valores de hBD-2 (pg/ml) en lavados nasales realizados a las 8h, de individuos sometidos a diferentes estímulos.	64
Cuadro 4	Valores de hBD-2 (pg/ml) en lavados nasales realizados a las 48h, de individuos sometidos a diferentes estímulos.	65
Cuadro 5	Efectos secundarios reportados después de la aplicación intranasal de distintos estímulos, previo a la realización del lavado nasal para detectar hBD-2.	68
Cuadro 6	Detección de hBD-2 en biopsias de mucosa nasal, por técnica de inmunohistoquímica, después del cultivo con bacterias inactivadas por 48 h	70

INDICE DE FIGURAS

Figura A.	Función de los péptidos antimicrobianos en enfermedades inflamatorias	20
Figura B.	Modo de acción de los péptidos antimicrobianos	22
Figura 1.	Detección de hBD-2 por la técnica de ELISA en lavados nasales, a las 48h de aplicar distintos estímulos intranasales en un mismo grupo de individuos.	66
Figura 2.	Detección de hBD-2 por la técnica de ELISA en lavados nasales, a las 48h de aplicar dos estímulos intranasales distintos, en los mismos individuos.	67
Figura 3.	Biopsias nasales procesadas por inmunohistoquímica.	71

Figura 4. Inmunotinción positiva para hBD-2 después, en biopsia de mucosa nasal, a las 48 h de cultivo y estimulación con bacterias inactivadas. Aumento original 1000X. 72

I. TITULO

“INDUCCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN EPITELIO DE VÍAS RESPIRATORIAS”

II. RESUMEN

Antecedentes. El epitelio respiratorio produce péptidos antimicrobianos (PAMs), que previenen la colonización por una amplia diversidad de patógeno. La β -defensina 2 humana (hBD-2) y la Catelicidina son los PAMs mayor documentados en humanos. Diferentes moléculas bacterianas y el colecalciferol han sido implicados su producción.

Objetivo. Inducir la producción de hBD-2 y catelicidina después de la estimulación del epitelio respiratorio con bacterias inactivadas y colecalciferol.

Métodos. Primero se realizó un estudio *in vitro*, estimulando células A-549 con bacterias inactivadas y colecalciferol. En un segundo estudio, esta vez con un modelo *in vivo*, se realizaron lavados nasales a 12 voluntarios sanos, en condiciones basales, y posterior a un reto nasal, donde por separado se estimuló con bacterias inactivadas (20 millones), colecalciferol (400 IU), mezcla de bacterias inactivada y colecalciferol, o con un placebo que contenía solución salina isotónica y glicerol. Finalmente se realizó inmunohistoquímica en biopsias nasales, después de la estimulación por 48 h con bacterias inactivadas, para identificar la presencia y localización de hBD-2.

Resultados. No se detectó hBD-2 o catelicidina por ELISA en el sobrenadante del cultivo de células A-549, después de ser estimuladas con bacterias inactivadas y/o colecalciferol. Se detectaron niveles elevados de hBD-2 (4668.99 ± 2829.33 pg/ml) por ELISA, en el liquido de lavado nasal, posterior al reto con bacterias inactivadas. De manera interesante, cuando se aplicó una prueba t de student para muestras dependientes, se encontró que los valores de hBD-2 se incrementaban aún más, al estimular con la mezcla de bacterias inactivadas y colecalciferol ($p=0.013$). No se detectó hBD-2 posterior al reto nasal con colecalciferol solo, ni posterior al reto con el placebo. Por medio de inmunohistoquímica fue posible localizar a la hBD-2 en el epitelio.

Conclusiones. la hBD-2 puede ser inducida en el epitelio nasal, tras la estimulación con bacterias inactivadas. El colecalciferol podría tener un efecto sinérgico con las bacterias inactivadas, en la producción de hBD-2, al menos en el epitelio nasal. La estimulación de la inmunidad innata para producir hBD-2, podría ser utilizada para prevenir e inclusive tratar infecciones causadas por patógenos respiratorios.

III. ABSTRACT

Background. The airway epithelium produces antimicrobial peptides (AMPs) that prevent colonization of host tissues by a wide range of pathogens. Human β -defensin 2 (hBD-2) and Cathelicidine are the most well documented AMPs in humans. Several bacterial products and cholecalciferol have been implicated in the production of these peptides.

Aim of study. To induce the production of hBD-2 and Cathelicidine after stimulation of the respiratory epithelia with inactivated bacteria and cholecalciferol.

Methods. First, an *in vitro* study stimulating A-549 cells with inactivated bacteria and cholecalciferol was conducted. After that a second *in vivo* study, where a nasal lavage (NL) was performed in 12 healthy volunteers in basal conditions, and after a nasal challenge with separate and subsequent stimuli with either inactivated bacteria (20 million), cholecalciferol (400 IU), the mixture of inactivated bacteria and cholecalciferol, or sham-challenge with glycerol plus isotonic saline solution. Finally, immunohistochemistry was performed in nasal biopsies 48 hours after stimulation with inactivated bacteria to identify the presence of hBD-2.

Results. We were unable to detect hBD-2 or Cathelicidine by ELISA in the supernatant of A-549 cell cultures stimulated with inactivated bacteria and/or cholecalciferol. Increased levels of hBD-2 (4668.99 ± 2829.33 pg/ml) were measured with ELISA in NL fluids following bacterial challenge. Intriguingly, higher levels of hBD-2 were measured following the stimulation with the mixture of inactivated bacteria and cholecalciferol, when a student's t test for dependent samples was applied ($p= 0.013$). However, hBD-2 concentrations were below the limit of detection in NL fluids at baseline, and after the administration of cholecalciferol alone or the sham-challenge. Through immunohistochemistry, hBD-2 was predominantly localized to the epithelium.

Conclusions. hBD-2 can be induced in the nasal mucosa after administration of inactivated bacteria. Cholecalciferol could act as a synergistic agent in the production of hBD-2, at least in the nasal epithelium. Stimulation of the innate immune system to produce hBD-2 could be used to prevent or even treat infections caused by respiratory pathogens.

Key words: antimicrobial peptides; defensins; host defense; nasal mucosa; immunostimulants; inactivated bacteria.

IV. MARCO TEORICO

LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS:

El sistema inmune de los organismos multicelulares tiene un amplio arsenal para proteger al huésped de los constantes ataques de los microorganismos.¹ Los péptidos antimicrobianos (PAM), también conocidos como péptidos codificados genéticamente,^{2,3} son producidos en muchos organismos incluyendo bacterias, insectos, plantas y vertebrados, donde cumplen una importante función en el sistema de defensa.⁴⁻⁶ Estos polipéptidos pueden proteger contra un amplio rango de microorganismos, incluyendo bacterias, virus, hongos y ciertos parásitos.^{7,8} Por lo anterior, podemos considerar a los PAM como componentes primitivos del sistema inmune que han evolucionado con diferentes especies, incluyendo, a los humanos.⁹ En los humanos y en los mamíferos en general, estos péptidos actúan en los fagocitos donde ayudan a matar a los microorganismos ingeridos; también actúan en los epitelios de las mucosas, donde previenen la colonización de los tejidos del huésped por los patógenos.⁵⁻¹⁰ Gracias a la creciente investigación sobre esta tema, recientemente se han descrito otros efectos biológicos de los PAM como: (1) neutralización de endotoxinas,^{11,12} (2) actividad semejante a quimiocinas,¹³ (3) actividades inmunomodulatorias que unen al sistema inmune innato con el adaptativo,^{14,15} (4) e inducción de angiogénesis y reparación de

heridas^{16,17}. La mayoría de los PAM tienen características en común. Por ejemplo, la mayoría son menores a 10kDA, tienen una carga neta positiva, son hidrofóbicos y son activos contra las membranas de microorganismos.¹⁸

Las características antimicrobianas, antitumorales, y su posible rol en enfermedades inflamatorias, hace de los PAM candidatos promisorios como agentes terapéuticos.^{19,20}

RESEÑA HISTÓRICA:

En 1981, Steiner et al, aislaron el primer péptido antimicrobiano de la pupa de una polilla (*Hyalophora. Cecropia*).²¹ Para 1985 Ganz, Selsted, et al, aislaron e identificaron la estructura de una clase de péptidos encontrados en los gránulos de polimorfonucleares en conejos y humanos. Este grupo de investigadores emplearon por primera vez el término “defensinas”, al encontrar que los péptidos eran bactericidas contra microorganismos gram-negativos y gram-positivos, y además inducían inactivación del *cryptococcus neoformans* y del *herpes virus tipo 1*.^{22,23}

Zaslof descubrió, en 1987, que la piel de una rana (*Xenopus laevis*) contenía glándulas multicelulares ricas en PAM, a las que denominó magaininas.²⁴

La importancia de los PAM para la investigación y aplicación en humanos sobrevino en el año de 1995, cuando Bensch et al, aislaron de 4800 litros de plasma humano la primera β -defensina humana (hBD-1).²⁵ La segunda β -defensina humana (hBD-2) fue aislada de la piel en 1997 por Harder et al.²⁶ En el 2000, Harder, Hoffert, y Terán evidenciaron que la hBD-2 se expresa de manera

basal en pocos tejidos, pero puede ser inducida en pulmones y tráquea, después de la exposición a patógenos.²⁷

Después de estos eventos la investigación sobre los PAM ha sido extensa, de tal manera que se conocen 895 péptidos en el medio ambiente, de los cuales 30 provienen de mamíferos; este listado se encuentra en una base de datos de la Universidad de Trieste. (<http://www.bbcm.units.it/~tossi/pag1.htm>)

La finalización en la secuenciación del genoma humano ha permitido la búsqueda de nuevos genes para β -defensinas, encontrándose 28 genes en el cromosoma 8,²⁸ lo cual sugiere la existencia de otros PAM en el humano.

CLASIFICACIÓN DE LOS PAM:

En base a la estructura tridimensional y a su composición general, los PAM pueden ser clasificados en cinco grupos.

Grupo I. PAM α -helicoidales: son péptidos sin cisteínas, como las cecropinas obtenidas del cerdo, magaininas obtenidas de ranas, y la proteína antimicrobiana catiónica humana (hCAP-18) precursor de la catelicidina.

Grupo II. PAM ricos en cisteína: la mayoría de estos péptidos comparten seis residuos de cisteína, formando tres puentes disulfuro intramoleculares. Las posiciones de estos puentes disulfuro se encuentran principalmente entre C1-C4, C2-C5, C3-C6. Como ejemplo tenemos a las defensinas en los mamíferos, y protegrinas en cerdos. La drosomicina, péptido aislada de la mosca, contiene cuatro puentes disulfuro.

Grupo III. PAM con plegamiento β : Se caracterizan por tener aproximadamente 20 residuos y uno o dos enlaces disulfuro que estabilizan su estructura de hojas-b. Pertenecen a este grupo las taquilepsinas y la polifemusina II obtenidas del *Limulus polyphemus* (cucaracha de mar), así como la Lactoferricina B (derivado proteolítico de la lactoferrina).

Grupo IV. PAM con alta proporción de uno o dos aminoácidos: estos péptidos están compuestos por un número elevado de aminoácidos que se repiten de manera regular. A este grupo pertenece la histatina, rico en histidina y aislado de saliva humana; péptidos ricos en prolina como catelicidina (LL-37), Bactenecinas (Bac-5 y Bac-7); y péptido PR-39 rico en arginina, aislado de leucocitos porcinos.

Grupo V. PAM con modificaciones inusuales en aminoácidos: este grupo tiene péptidos con aminoácidos modificados de manera inusual, y son producidos principalmente por bacterias. Como ejemplo podemos citar a la Nisina, producida por *Lactococcus lactis*, y compuesta de aminoácidos raros como lantionina, 3-metillantionina y dehidrobutirina. Los péptidos en este grupo presentan conformaciones poco usuales, por ello las gramicidinas se incluyen en este grupo, pues forman una estructura con plegamiento- β característica.^{20,29,30} (Ver cuadro A)

Cuadro A. Clasificación de los péptidos antimicrobianos.

GROUP NUMBER	GROUP NAME	MAIN CHARACTERISTICS	EXAMPLES
I	α -Helix AMPs	Peptides with no cysteins	Cecropins (pig); Magainins (frog); hCAP-18(human).
II	Cystein-rich AMPs	These peptides share six cystein residues, forming three intra-molecular disulphur bridges. The positions for these disulphur bridges are mainly between C1-C4, C2-C5, and C3-C6.	Defensins (mammals); Protegrins (pig); Drosomycin (fruit fly).

III	Beta-sheeted AMPs	Characterized for having approximately 20 residues, and one or two disulphide bonds stabilizing their beta-sheet structures.	Tachylepsin and polyphemusin (horseshoe crab); Lactoferricin B (Bovine).
IV	AMPs with a high proportion of one or two aminoacids	Peptides with no disulphide bonds but with a high content of one or two aminoacids, sequentially repeated along their structure.	Histatin (human saliva), Cathelicidin (LL-37); Bactenecins, PR-39 (porcine leukocytes).
V	AMPs with unusually modified aminoacids	Peptides with uncommon aminoacids, introduced by a posttranslational modification of their precursor peptide.	Nisin (<i>Lactococcus lactis</i>); Methyllantionine; Didehydroalanine; Didehydroaminobutyric acid.

*Extraído de Guaní-Guerra et al. Antimicrobial peptides. Clin Immunol 2010;135:1-11.

PRINCIPALES PAM EN EL HUMANO:

Los principales PAM en mamíferos y particularmente en humanos son: catelicidinas, defensinas e histatinas. (Ver cuadro B)

Catelicidinas

Las catelicidinas deben su nombre a que tienen una prosequencia que semeja a la proteína catelina (en inglés cathelin= cathepsin L inhibitor), aislada originalmente de neutrófilos porcinos. La estructura de esta molécula presenta un extremo amino-terminal, una prosequencia altamente conservada (catelina), y un extremo carboxilo-terminal que puede ser muy heterogéneo.³¹

En el humano solo se conoce un gen que codifica para catelicidina, se encuentra en el cromosoma 3 y es llamado CAMP.⁹ Este gen codifica para una sola pre-proteína, denominada precursor de catelicidina (hCAP18), el cual fue aislado en un principio en células de médula ósea y en queratinocitos en sitios de inflamación.³²⁻³⁵ El hCAP18 incluye un péptido en el extremo carboxilo terminal, denominado catelicidina ó LL-37, pues su estructura comienza con dos residuos de leucina y se compone de 37 aminoácidos. El procesamiento de LL-37 a partir de su precursor depende de la enzima proteinasa 3.³⁶ En el sudor el LL-37 puede

ser procesado en péptidos aún más pequeños conocidos como RK-30 y KS-30, los cuales comparten con catelicidina propiedades antimicrobianas.³⁷

El hCAP18/LL-37 es producido por diferentes tipos de células epiteliales. Entre estas células se encuentran los enterocitos del intestino grueso³⁸, células epiteliales del tracto urinario³⁹, células del epitelio respiratorio (incluyendo nariz y pulmón)^{40,41}, y queratinocitos^{42,43}. También puede ser expresada en células mieloides, neutrófilos³⁰, mastocitos⁴⁴ y monocitos⁴⁵.

Defensinas

Las defensinas son péptidos catiónicos, con un peso molecular de 3.5-4.5 kDa. Como se comentó previamente, pertenecen al grupo de los PAM ricos en cisteína. Sus seis residuos de cisteína forman tres puentes disulfuro intramoleculares característicos, cuyo espaciamiento, en conjunto con la estructura molecular del péptido origina 3 clases de defensinas: α -defensinas, β -defensinas, θ -defensinas.

α -Defensinas. Estos PAM tiene una longitud de 29-35 residuos, sus tres puentes disulfuro están localizados entre las cisteínas 1-6, 2-4, 3-5. Se han identificado seis α -defensinas en humanos.⁴⁸ En los gránulos azurófilos de los neutrófilos se encuentran cuatro α -defensinas denominadas HNP-1 a HNP-4 (HNP, del inglés “human neutrophil peptides”).^{49,50} Las otras dos alfa defensinas, defensinas humanas 5 y 6, se encuentran en las células de Paneth en el intestino delgado⁹, y en el tracto urogenital femenino.³⁰ Los genes que codifican para las α -defensinas y β -defensinas se encuentran en el cromosoma 8p23. Las defensinas, al igual que la mayoría de los PAM, son producidas como propéptidos.⁵²

β-Defensinas. La longitud de estos péptidos es de 36-42 residuos, sus tres puentes disulfuro están localizados entre cisteínas 1-5, 2-4, 3-6.¹⁹ En el ser humano se conocen hasta el momento seis β -defensinas, hBD-1 a hBD-6, pero el análisis genómico sugiere existen más. En general son expresadas en células epiteliales. La hBD-1 se expresa de manera constitutiva en células de epitelio respiratorio y urinario.^{53,54} La hBD-2 fue aislada por primera vez de escamas en psoriasis,⁵⁵ y se expresa en piel, epitelios respiratorio, gastrointestinal y urinario.⁵⁶⁻⁵⁹ La hBD-3 es la más catiónica de las defensinas, y fue aislada de piel con psoriasis en el 2001.⁶⁰ Este péptido se expresa en varias superficies epiteliales, de momento, se ha encontrado en mayor concentración en saliva y fluidos cervicovaginales en la mujer.⁶¹ La hBD-4 se ha encontrado expresada en testículos, estómago y útero.^{62,63}

θ-Defensinas. Son octapéptidos cíclicos, semejantes a lectina. Únicamente han sido aisladas de leucocitos de primates no humanos. Entre las más importantes de este grupo se encuentran la θ -defensina 1, aislada del mono rhesus y la retrociclina 2.^{64,65}

Histatinas. Familia de péptidos ricos en histidina. Entre los principales representantes de este grupo se encuentran las histatinas 1 y 3, que presentan una longitud de 38 y 32 residuos de aminoácidos respectivamente. Los genes que codifican a estas dos histatinas se encuentran en el cromosoma 4q12. Estos PAM se encuentran presentes en la saliva de los humanos.^{66,67}

REGULACIÓN GÉNICA Y MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE LOS PAM:

La expresión de estos péptidos está estrechamente regulada y depende de distintos mecanismos. En cuanto a catelicidina, recientes estudios han demostrado que su expresión es específica y dependiente del microambiente.⁴⁵ La vitamina D3 (VD₃) es un potente inductor de la expresión de LL-37 en keratinocitos, neutrófilos y monocitos.^{68,69} También produce este efecto en ciertas líneas celulares humanas, como en las células SCC5 de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, y en las células Calu-3 de adenocarcinoma de pulmón, que expresan marcadores de vías aéreas superiores. En un modelo in vitro, la administración conjunta de VD₃ y lipopolisacáridos (LPS), incrementó de modo sinérgico la expresión de CAMP en los neutrófilos.⁶⁹ En el tracto urinario, el principal estímulo para la producción y secreción de LL-37 es el contacto directo de las bacterias con las células epiteliales.³⁹ En las células epiteliales del colon el principal inductor de LL-37 es el butirato, un ácido graso de cadena corta producido por la flora normal del colon.^{45,70} En otros tipos celulares, como en las células de glándulas sudoríparas, la expresión de LL-37 es constitutiva.⁷¹

La expresión de hBD-1 es constitutiva, sin embargo, la expresión de hBD-2, hBD-3 y hBD-4 es inducible. En cultivos de células epiteliales se ha demostrado que la expresión de hBD-2 puede ser estimulada por interleucina (IL) -1 α , IL-1 β , Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), microorganismos gram-positivos, gram-negativos, *Cándida albicans*, *M. tuberculosis*, *M bovis*, LPS y lipoarabinomano (LAM).^{27,72,109,110} La VD₃ puede estimular la expresión del gen de hBD-2, pero de manera débil, su efecto es más importante cuando está en presencia de IL-1.⁶⁹

Las diferentes vías por las cuales estos estímulos se traducen en la expresión de las β -defensinas aún no son del todo conocidas. La evidencia actual indica que las

células epiteliales incrementan la expresión de hBD-2, por medio de diferentes productos bacterianos y a través de la interacción con receptores tipo “toll” (TLR) 2 ó 4.^{73,74} El TLR-2 reconoce proteoglicanos bacterianos y LAM, mientras que el TLR-4 reconoce LPS y ácido lipoteicoico.^{75,109} Recientemente se ha demostrado que los factores de transcripción nuclear AP-1 y NF-κB controlan la expresión de hBD-2 en queratinocitos, tras la estimulación con *Pseudomonas aeruginosa* (PA) e IL-1β.⁷

Cuadro B: Características de los principales péptidos antimicrobianos en humanos.

PAM	SOURCE	REGULATION AND INDUCTION STIMULI	ANTIMICROBIAL ACTIVITY	PLEIOTROPIC EFFECTS
α- Helical				
LL-37	Epithelial cells: gut, urinary tract, respiratory tract, skin. Leucocytes: neutrophils, monocytes mast and myeloid cells.	Constitutive and inducible by: VD3 (keratinocytes, monocytes, neutrophils) LPS (synergic effect with VD3) Butyric acid (colonocytes)	Broad spectrum activity. Specially active against: <i>Shigella sp</i> , Group A and Group B <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	Induction of chemotactic agents. Transcription reduction of proinflammatory molecules. Direct chemotactic activity. Angiogenesis.
Cystein rich				
α- defensins				
HNP-1,2,3,4	Neutrophil azurophilic granules	Constitutively expressed.	Broad spectrum activity against Gram (+) and Gram (-). Antiviral activity (Adenovirus). Defense against orally ingested pathogens (<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella Typhimorium</i>).	HNP 1 to 3 increase the expression of TNF and IL-1 in monocytes. Chemotactic activity. Unknown.
HD-5,6 (Cryptidins)	Paneth cells and epithelial cells of the female genitourinary tract.	Constitutively expressed. Bacterial products (muramyl dipeptide)	Broad spectrum activity. Defense against orally ingested pathogens (<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella Typhimorium</i>).	Chemotactic activity. Cytokines production. Chemotactic activity. Cytokines production.
β- defensins				
HBD-1	Lung and urinary tract epithelial Cells	Constitutively expressed.	Broad spectrum activity.	Chemotactic activity. Cytokines production. Chemotactic activity. Cytokines production.
HBD-2	Skin, lung, gut and genitourinary tract epithelial cells.	Inducible expression by: IL-1 α , IL-1 β , Gram (+), Gram(-) TNF, <i>C. albicans</i> , LPS, LAM.	Broad spectrum activity. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> , <i>M. tuberculosis</i> .	Cytokine and chemokine expression to a greater extent than those observed in HBD-1,2,4.
HBD-3	Several epithelial surfaces. High concentration in saliva and vaginal swabs.	Inducible expression.	Broad spectrum activity. <i>S. aureus</i> , <i>Pityrosporum ovale</i> , <i>HIV</i> .	Cytokine and chemokine expression to a greater extent than those observed in HBD-1,2,4.
HBD-4	Testicles, uterus and stomach.	Inducible expression.	Broad spectrum activity.	Chemotactic activity. Cytokines production.
High proportion of 1 or 2 aminoacids:				
Histatins 1 and 3	Isolated from human saliva	Not reported	<i>Candida albicans</i> .	Unknown.

HBD, Human beta defensins; HD, Human defensins; HIV, Human immunodeficiency virus; HNP, Human neutrophil peptides; LAM, Lipoarabinomannan; LL-37, Cathelicidin; LPS, Lipopolysaccharides; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; VD3, Cholecalciferol. *Extraído de Guaní-Guerra et al. Antimicrobial peptides. Clin Immunol 2010;135:1-11.

FUNCIONES DE LOS PAM:

A los PAM se les atribuyó en un principio únicamente un efecto antimicrobiano. Actualmente sabemos que en realidad son péptidos multifuncionales. Podríamos dividir estas funciones en dos grandes grupos: aquellas relacionadas con la protección contra microorganismos, y aquellas que modulan las respuestas inflamatorias, y por ende están asociadas a enfermedades crónicas, inflamatorias y posiblemente neoplásicas.⁷⁷ (Ver Figura A)

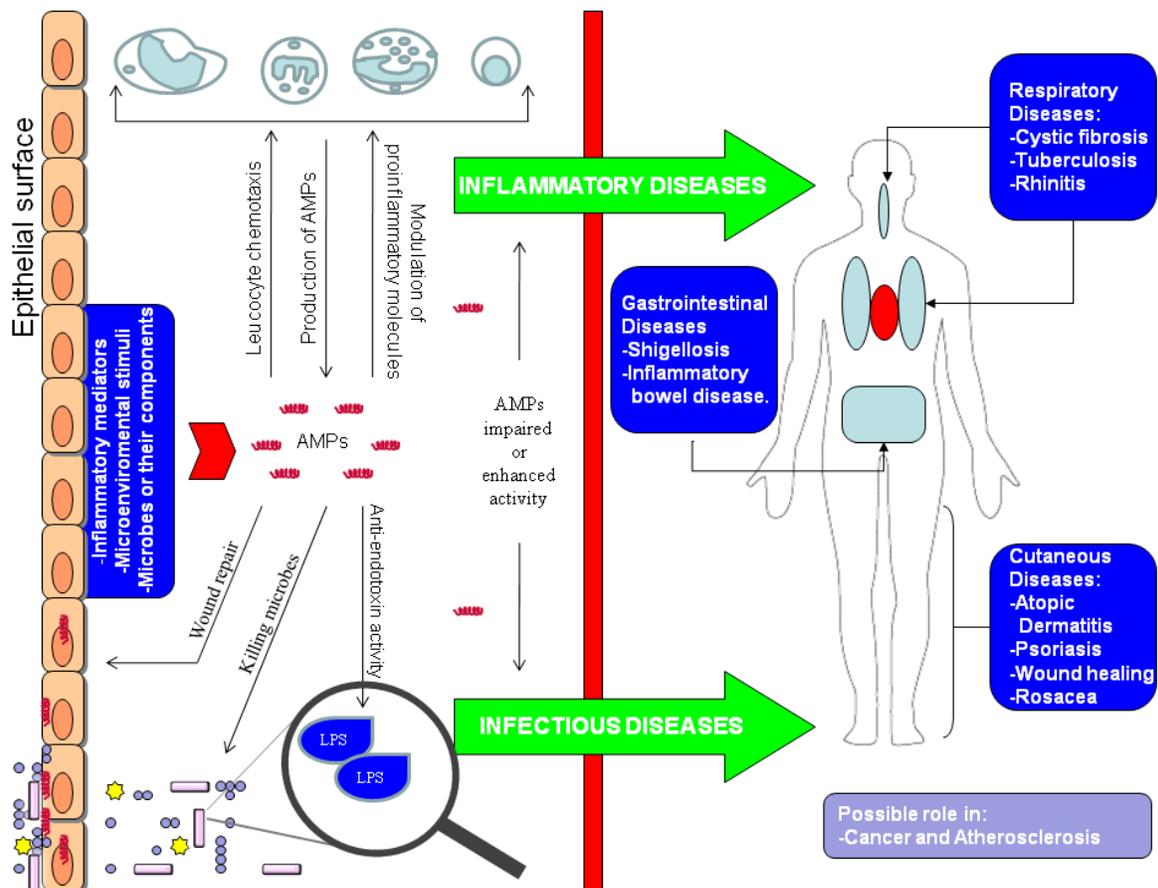


Fig A. Functions of AMPs in inflammatory diseases. Various cell types are activated by microbes and inflammatory mediators, causing the production and release of AMPs. This peptides show different functions, including antimicrobial activity and modulation of the inflammatory response in different diseases.

*Extraído de Guaní-Guerra et al. Antimicrobial peptides. Clin Immunol 2010;135:1-11.

FUNCIÓN EN LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

Entre las diversas funciones que estas moléculas pueden tener en la interacción del sistema de defensa con los microorganismos se encuentran: efecto antimicrobiano directo, estimulación de la inmunidad innata y adquirida, quimiotaxis, estimulación de citocinas, bloqueo y depuración de endotoxinas.

Mecanismos de la actividad antimicrobiana directa:

El mecanismo exacto por el cual ejercen sus propiedades antimicrobianas aún es desconocido, y es probable que existan varios modelos dependiendo de la clase y subclase del PAM involucrado. Uno de los modelos se conoce como “Barrel stave” y fue descrito en magainina 2. Este modelo postula que los PAM dada su carga positiva, son atraídos hacia las membranas celulares de las bacterias, causando un incremento en la permeabilidad de la membrana, que se traduce en lisis y muerte celular.⁷⁸ Otro mecanismo se conoce como “Carpet model” y fue propuesto para describir el mecanismo de acción de la dermaseptina. En este modelo se propone que los péptidos “alfombran” o cubren la superficie de la membrana bacteriana, alineando sus residuos hidrofílicos con la cabeza de los fosfolípidos localizados en la bicapa bacteriana. Posteriormente los péptidos se reorientan hacia sus centros hidrofóbicos, formando una esfera que desintegra o causa disrupción en la membrana bacteriana.⁷⁹ (Ver Figura B) Se han propuesto y descrito otros mecanismos de acción para los PAM, que incluyen la formación de canales iónicos,⁸⁰ activación o bloqueo de blancos intracelulares tras la permeabilización de la membrana bacteriana,^{81,82} y la inhibición de la entrada de

virus a la célula por bloqueo de receptores y unión a glicoproteínas, mecanismo recientemente descrito para la retrociclina 2.⁸³

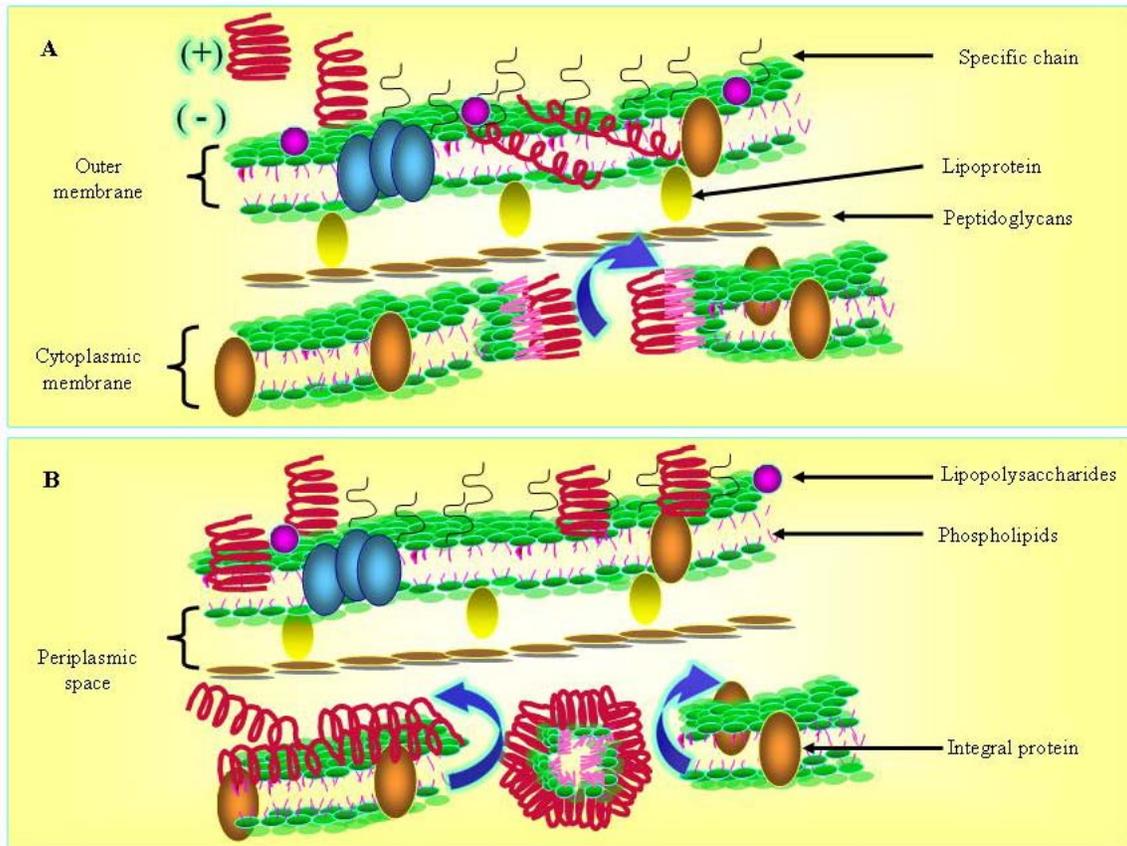


Fig B. Mode of action of AMPs. (A) Barrel stave model. The peptides binds to the cell membrane, then the peptides themselves insert into the hydrophobic core of the membrane forming a pore, causing leakage of cytoplasmic material and death of the cell. (B) Carpet model. Peptides binds to the phospholipids at the outer surfaces of the cell membrane, followed by the alignment of the peptide monomers, then the peptides reorient themselves towards the hydrophobic core of the membrane causing the disintegration of the lipid bilayer.

*Extraído de Guaní-Guerra et al. Antimicrobial peptides. Clinical Immunology. Clin Immunol 2010;135:1-11.

Catelicidina en enfermedades infecciosas

Existe evidencia, que de manera indirecta, sugiere un efecto antimicrobiano del la catelicidina. Apoyando lo anterior podemos citar que se ha demostrado una disminución en la expresión de LL-37 en biopsias de intestino en pacientes con

infecciones por *Shigella*.⁸⁴ La administración de butirato de sodio en modelo experimental de conejos con shigellosis, produce mejoría del cuadro clínico y disminución en las concentraciones de este microorganismo, tras el incremento en LL-37.⁸⁵

Se considera que en piel la catelicidina tiene una importante acción antibacteriana contra *Streptococcus del grupo A*, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 2-4 μM , condiciones semejantes a las fisiológicas. También presenta un efecto antimicrobiano discreto sobre *Streptococcus del grupo B*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, pues este disminuye al incrementar las concentraciones de sal en los medios de cultivo.¹⁶ En otro estudio in Vitro se demostró que la catelicidina puede inhibir el crecimiento de *E. coli* y *P.aeruginosa* con CMI de 16 $\mu\text{g/ml}$, y el de *E. faecalis* y *S. aureus* con CMI de 31 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, nuevamente al incrementar las concentraciones de NaCl en el medio a 100 mM, se evidencia que la actividad del LL-37 disminuye en 2 a 8 veces.⁸⁷ La adición a los medios de cultivo de cationes como Mg^{2+} y Ca^{2+} , tratando de mimetizar condiciones más fisiológicas, disminuye aún más la actividad antimicrobiana de este péptido que concentraciones equivalentes de monoaniones (Na^+).^{87,88} Se considera además, que la concentraciones de catelicidina en zonas de infección, inflamación y en lavados broncoalveolares de niños sanos es de 5 a 15 $\mu\text{g/ml}$ (1 a 3 μM),^{89,90} cantidades menores a las cuales ejerce un efecto antimicrobiano contra la mayoría de los microorganismos. Esta débil actividad antimicrobiana en condiciones fisiológicas, nos sugiere que probablemente la función primaria de catelicidina no sea su capacidad para matar microorganismos de manera directa. Actualmente se han descrito in vitro múltiples efectos de LL-37 en condiciones semejantes a las

fisiológicas. Catelicidina puede inducir la transcripción y liberación de quimiocinas, entre ellas IL-8, proteína quimioatrayente de monocitos 1 y 3 (MCP-1, MCP-3); reclutando así células de la inmunidad innata requeridas para remover los microorganismos invasores.^{91,92,93}

La Catelicidina también puede inhibir la transcripción de citocinas y moléculas proinflamatorias como TNF- α , óxido nítrico, y factor tisular; producidas por LPS y ácido lipoteicoico (LTA) en monocitos y macrófagos, efecto posiblemente involucrado en la resolución del proceso inflamatorio.⁹⁴⁻⁹⁶ Al bloquear los LPS, la catelicidina inhibe la liberación de TNF- α , y esto la convierte en un posible tratamiento para la sepsis y choque séptico inducido por gram-negativos.^{5,97} Otra propiedad importante de este péptido es su capacidad para inducir quimiotaxis de manera directa sobre monocitos, neutrófilos y linfocitos T CD4+, a través de la interacción con el receptor semejante al péptido formilo 1 (FPRL1).^{98,99} El FPRL1 parece también estar involucrado con LL-37 en la estimulación y promoción de angiogénesis.¹⁰⁰ Catelicidina también induce la liberación de histamina por mastocitos, proceso que incrementa la permeabilidad vascular y favorece la infiltración de neutrófilos a los tejidos inflamados.¹⁰¹ La catelicidina es capaz de inducir cambios fenotípicos y funcionales en las células dendríticas que incrementan su capacidad presentadora de antígenos, promoviendo una respuesta tipo Th1, por una mayor interacción con linfocitos T, estableciendo así un impacto en el desarrollo de la inmunidad adaptativa.¹⁰² LL-37 ha mostrado cierta efectividad antimicrobiana en modelos in vitro y en animales contra *Trypanosoma brucei*,¹⁰³ *Candida albicans*,¹⁰⁴ *Treponema pallidum*,¹⁰⁵ virus de la vacuna,¹⁰⁶ y lentivirus entre otros.¹⁰⁷

Defensinas en enfermedades infecciosas

Las α -defensinas, en particular HNP 1-4, tienen actividad antibacteriana contra microorganismos fagocitados por los neutrófilos. HNP-1 muestra una potente actividad antiviral contra adenovirus y en menor grado contra VIH y papilomavirus.¹¹⁰⁻¹¹²

Estos péptidos también pueden incrementar la expresión de TNF e IL-1 en monocitos.¹¹³ A bajas concentraciones pueden incrementar la proliferación de fibroblastos y células epiteliales en vías respiratorias.^{115,116} Estas defensinas de los neutrófilos tienen propiedades quimioatrayentes sobre monocitos, linfocitos T, y células dendríticas.¹¹⁶

Las β -defensinas tienen efecto antimicrobiano contra bacterias gramnegativas, grampositivas, virus y hongos. hBD-2 ha demostrado actividad antimicrobiana modelos *in vitro* contra *Pseudomonas aeruginosa* a concentraciones de 5 μ g/ml, contra *E. coli* a concentraciones de 6 μ g/ml , y contra *Cándida albicans* a concentraciones de 18 μ g/ml.²⁷ hBD3 tiene una potente actividad antibacteriana contra *S. aureus*, mientras que hBD-2 tiene un pobre efecto y debe trabajar de manera sinérgica con otros PAM para matar a *S. aureus*.¹¹⁷ Recientemente se ha demostrado que estos péptidos pueden inhibir el crecimiento de las micobacterias y se ha sugerido un posible rol de hBD-2 y hBD-3 en la patogénesis de la tuberculosis pulmonar en humanos.^{108,118}

Se han detectado al igual que para LL-37. Concentraciones de hBD-2 en lavados bronquioalveolares de recién nacidos que van desde 0 μ g/ml en aquellos sin

proceso infeccioso identificado, hasta una media de 6 µg/ml en aquellos con infección sistémica.⁹⁰

Al igual que otros péptidos las β-defensinas también pueden modular algunas funciones del sistema inmune. Algunos de estos péptidos pueden inducir quimiotaxis de neutrófilos, linfocitos T y células dendríticas inmaduras tras unirse al receptor de quimiocinas CCR6.¹¹⁹ También pueden inducir quimiotaxis en mastocitos, e inducir su degranulación por un mecanismo aún no dilucidado.¹²⁰ hBD-2 puede activar a células dendríticas inmaduras promoviendo su maduración, a través de un mecanismo mediado por TLR-4.¹²¹ Las β-defensinas pueden inducir la producción de IL-6, IL-10, proteína 10 inducible por interferón, proteína-1 quimiotáctica de monocitos, proteína inflamatoria de macrófagos 3-α, y RANTES, principalmente en queratinocitos. Se considera que la hBD-3 induce la expresión de estas citocinas y quimiocinas en mayor grado que las hBD-1, 2, y 4.¹²²

Este grupo de péptidos ha demostrado inhibir la replicación de VIH in vitro, y hBD-3 en particular, puede inhibir la infección por VIH al competir con el factor derivado de estroma, ligando natural para CXCR4.¹²³ Por otra parte hBD-3 también ha demostrado tener actividad antifúngica contra *Malassezia (Pityrosporum ovale)*¹²⁴.

Las θ-defensinas, como se describió previamente, se han encontrado solo en primates no humanos.¹²⁵ La θ-defensina 1 tiene la particularidad de ejercer actividad antimicrobiana independientemente de la concentración de sal.⁶⁴ Las retrociclinas tienen un potencial importante como agentes contra el VIH, influenza A, y herpes virus simple. Estos péptidos tienen la capacidad de unirse a moléculas de superficie que contienen carbohidratos, tales como la gp120 y el CD4.⁶⁵ Se ha

demostrado que también pueden matar e inactivar al *Bacillus anthracis* y sus toxinas.¹²⁶

Las Histatinas tienen un efecto antimicrobiano principalmente contra hongos. Este efecto antifúngico ha sido descrito principalmente contra *Candida albicans*, e inclusive se ha demostrado una asociación entre niveles bajos de histatinas en pacientes con VIH, y una mayor incidencia en candidiasis oral.^{127,128}

LA ETERNA LUCHA DEL EPITELIO RESPIRATORIO CONTRA LOS MICROORGANISMOS:

El contacto inicial con los microorganismos patógenos se lleva a cabo en las superficies internas o externas del cuerpo. La superficie de las vías respiratorias es uno de los principales lugares donde se lleva a cabo la deposición e introducción de los microorganismos.³⁰ Esta superficie epitelial es la más grande en el cuerpo del ser humano, que se encuentra en contacto con el medio externo. Para evitar que se produzca infección por microorganismos, el aparato respiratorio cuenta con varios sistemas de defensa, incluidos el filtrado de partículas en la nariz, la secreción mucosa, el movimiento ciliar, la deglución, la expectoración, el estornudo, el reflejo tusígeno, y por supuesto la producción de péptidos antimicrobianos.¹²⁹ A las células epiteliales se les ha atribuido recientemente un papel importante en la defensa innata contra microorganismos, acción que ejercen en parte por la producción de defensinas y catelicidina.¹³⁰ La falla en cualquier punto del sistema de defensa se traduce en la adquisición de las enfermedades

con más alta prevalencia en el ser humano como son la faringitis, rinosinusitis, otitis. Las infecciones agudas de la vía respiratoria alta son el principal motivo de consulta en México (SINAIS 2006); por otra parte la prevalencia de faringitis, secundaria a *Streptococcus del grupo A*, es de 616 millones de individuos afectados alrededor del mundo. La disrupción en el sistema de defensa respiratorio también puede ocasionar enfermedades asociadas con altas tasas de mortalidad como la neumonía, que actualmente ocupa el 8vo lugar entre las principales causas de muerte en México (SINAIS 2005). El mejorar o fortalecer los factores que atañen al huésped, deberá traducirse en un menor número de infecciones en las vías respiratorias.

MODULACIÓN DE LA INMUNIDAD INNATA EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN:

Actualmente se clasifica la respuesta del huésped contra la infección en 2 categorías: inmunidad innata e inmunidad adquirida. La inmunidad innata incorpora los mecanismos más rápidos e inespecíficos como son la elaboración de citocinas, activación del complemento, respuesta fagocítica, y la defensa de superficies que incluye a los PAM.¹³² Tal y como se ha comentado previamente en este documento, estos péptidos además de sus propiedades antimicrobianas, puede actuar como factores de crecimiento, mediadores proinflamatorios, quimiocinas e inductores de la inmunidad adaptativa; de ahí que se halla propuesto el nombre de “alarminas” para denominar a estas moléculas.¹³⁰

Por otra parte en los últimos años, hemos aprendido la importancia del sistema de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, mediado por los TLR.¹³¹ Estos receptores son homólogos a los encontrados en *Drosophila* y que fueron llamados Toll.¹³² Se pueden expresar en monocitos, macrófagos, y células epiteliales. Hasta el momento se han descrito 10 TLR humanos, los cuales se unen a un amplio rango de ligandos bacterianos. Los componentes de las paredes celulares de bacterias grampositivas (proteoglicanos) y el LAM se unen y activan al TLR2. TLR3 se une a los RNA de doble cadena sintéticos y virales. Los LPS y el ácido lipoteicoico activan TLR4. TLR5 es activado por flagelina. TLR6 es requerido por TLR2 para el reconocimiento de proteoglicanos. TLR7 y 8 reconocen RNA viral de cadena simple, mientras que TLR9 reconoce los motivos CpG del DNA bacteriano. Además de la interacción de TLR2 con hBD2, descrita previamente en este documento, los TLR9 al ser activados por los motivos CpG (en particular los clase A), pueden estimular a las células plasmocitoides dendríticas para secretar IFN- α , y a las células NK para secretar IFN- γ , mejorando así la defensa contra virus y contra bacterias intracelulares respectivamente.^{75,131} Esta característica puede permitirnos en un futuro combatir a las infecciones virales (para las cuales prácticamente no hay tratamiento en la actualidad) y que afectan sobre todo a niños e inmunocomprometidos. Dado el incremento en cepas de microorganismos multirresistentes a antibióticos, en el 2006 el “National Research Council National Academy of Sciences” convino que se debe incrementar la inmunidad innata como mecanismo para combatir a los microorganismos causantes de infecciones.¹³² Lo anterior en base a la escasez de nuevos antibióticos, y a que la estimulación del sistema inmune innato podría propiciar una baja tasa de resistencia en

comparación a la inducida por la presión de los antibióticos. Además, prevendría adquisición de infecciones, incluida la influenza, y podría ayudar como defensa en el caso de bioterrorismo.

V. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la inmunidad innata se ha convertido en una opción importante y relativamente inexplorada para combatir los procesos infecciosos, ya sean bacterianos, fúngicos, o virales. Recientemente se le ha atribuido al epitelio respiratorio un papel muy importante entre los mecanismos de inmunidad innata. Con un estímulo inmunomodulador adecuado podríamos inducir la producción de péptidos antimicrobianos y de otros mecanismos de defensa importantes, tales como la activación de TLR y la producción de interferones. De esta manera, podríamos prevenir y tratar procesos infecciosos en la vía aérea, tales como gripa, rinosinusitis y neumonía. Por otra parte podríamos combatir microorganismos multirresistentes a antibióticos, como algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, y *Mycobacterium tuberculosis*. Todo esto se traduciría en una disminución en la morbilidad y mortalidad, además del beneficio económico que supone un menor uso de medicamentos, menos días laborales perdidos, así como un menor número de internamientos.

VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los péptidos antimicrobianos son un importante mecanismo de defensa en las vías respiratorias.

Se ha demostrado estudios *in vitro*, que hBD-2 puede ser producida tras la estimulación de TLR-2 y TLR-4, por peptidoglicanos y lipopolisacáridos; existen fórmulas con bacterias inactivadas gran positivas y gran negativas que contienen peptidoglicanos y lipopolisacáridos respectivamente, mismas que son utilizadas con fines terapéuticos distintos a la producción de PAM. Por otra parte, LL-37 puede ser producida tras la estimulación de los receptores de VD3 principalmente en células epiteliales cutáneas; sin embargo, la información de este efecto en células epiteliales respiratorias aún es precaria.

Luego entonces, podríamos inducir en el epitelio respiratorio (inicialmente *in vitro* y posteriormente *in vivo*) la producción de hBD-2 tras la aplicación de bacterias inactivadas que estimulen TLR-2 y TLR-4; y a su vez, podríamos inducir la producción de LL-37, tras la aplicación de VD3. El incrementar la producción de péptidos antimicrobianos por éste métodos supondría, posiblemente, la adquisición de una nueva herramienta para prevenir el contagio de enfermedades respiratorias, así como la posibilidad de combatir las existentes.

¿Será posible inducir la producción de péptidos antimicrobianos en el epitelio respiratorio, tras la estimulación con bacterias inactivadas y VD3?

VII. HIPÓTESIS

- La estimulación del epitelio respiratorio con Bacterias atenuadas y VD3 inducirá la producción de hBD-2 y Catelicidina, respectivamente.

VIII. OBJETIVOS

GENERAL

- Identificar si la estimulación del epitelio respiratorio con bacterias inactivadas y VD3 logra inducir la producción de péptidos antimicrobianos.

Para comprobar nuestra hipótesis y perseguir nuestro objetivo general, diseñamos tres estudios:

Estudio No.1:

-Modelo in vitro: Inducción de péptidos antimicrobianos en células A-549 (adenocarcinoma bronquial) tras la estimulación con bacterias inactivadas y VD3.

Estudio No.2:

-Modelo in vivo: Inducción de péptidos antimicrobianos en mucosa nasal, después de la administración de bacterias inactivadas y/o VD3.

Estudio No.3:

-Modelo in vitro: Detección y localización de hBD-2 en biopsias de mucosa nasal tras la estimulación con bacterias inactivadas.

IX. ESTUDIO NO.1

Inducción de péptidos antimicrobianos en células A-549 (adenocarcinoma bronquial) tras la estimulación con bacterias inactivadas y VD3.

HIPÓTESIS

La aplicación de VD3 y Bacterias atenuadas a un cultivo de células epiteliales bronquiales (A-549), producirá un incremento en la expresión de Catelicidina y hBD-2 respectivamente.

OBJETIVOS:

GENERAL

-Determinar los niveles de catelicidina y hBD-2 en el sobrenadante del cultivo de células de epitelio bronquial, tras la exposición a diferentes concentraciones de VD3 y Bacterias atenuadas.

PARTICULARES

-Determinar el tiempo en el cual se produce la mayor concentración de catelicidina y hBD-2, tras la aplicación del estímulo.

-Identificar si existe un efecto sinérgico entre VD3 y Bacterias atenuadas en la expresión de catelicidina y hBD-2.

-Identificar si distintas especies bacterianas de manera aislada o combinada, modifican la expresión de catelicidina y hBD

MATERIAL Y MÉTODOS

TIPO DE ESTUDIO:

-Investigación básica. (Estudio *in vitro*)

POBLACIÓN DE ESTUDIO:

-Células de epitelio bronquial A-549 (adenocarcinoma bronquial).

VARIABLES DE ESTUDIO:

- INDEPENDIENTES:
 - VD3
 - Definición Conceptual: llamada también colecalciferol, es la forma activa de la vitamina D. Puede obtenerse de la dieta o por la acción de los rayos ultra violeta tipo B (UVB) sobre el 7-dehidrocolesterol en la piel. Inicialmente se identificó su rol sobre la homeostasis del calcio, pero actualmente se sabe que tiene un papel modulador en el sistema inmune.
 - Definición Operativa: VD3 (Colecalciferol), laboratorios SIGMA. Frasco con 5 g. Se aplicarán 3 dosis distintas sobre el cultivo de células epiteliales por 24 y 48h.
 1. 50 UI
 2. 100 UI

3. 200 UI

- Escala de medición: cuantitativa contínua.
- Unidad de medición: UI

- INDEPENDIENTES:

- o Bacterias inactivadas.

- Definición conceptual: bacterias sometidas a un proceso de inactivación (calor), que inhibe todo proceso metabólico y por ende su potencial actividad patogénica.
- IPI-ASAC: fórmula liofilizada Sublingual III, Frasco 2. (*S. Pneumoniae*, *Brahmanela catarrhalis*, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus alfa-hemolítico*, *Streptococcus beta-hemolítico*, *Streptococcus fecales*, *S. epidermidis*, *Bordetella pertussis*, *proteus sp*, *pseudomonas sp*, *E. coli*, *corynebacterium diphteriae*).

Concentraci n= 2600 millones de bacterias / ml.

Se aplicarán sobre el cultivo de células epiteliales 3 concentraciones diferentes por 24 y 48h. Las concentraciones se harán por multiplicidades de infección (ratos bacterias/células) de 100:1, 200:1, 800:1. Cada pozo se siembra con 100 000 células.

1. 10 millones de bacterias
 2. 20 millones de bacterias
 3. 80 millones de bacterias
- Escala de medición: cuantitativa contínua.
 - Unidad de medición: bacterias / ml.

- INDEPENDIENTES:

- Bacterias inactivadas.

- Definición conceptual:
 - Gram Negativos: *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella sp.*
 - Gram Positivas: *S. aureus*, *Streptococcus beta-hemolítico*, *Streptococcus pneumoniae*.

Concentración= 2600 millones de bacterias / ml.

Se aplicarán sobre el cultivo de células epiteliales 3 concentraciones diferentes por 24 y 48h. Las concentraciones se harán por multiplicidades de infección (radios bacterias/células) de 100:1, 200:1, 800:1. Cada pozo se siembra con 100 000 células.

1. 10 millones de bacterias
2. 20 millones de bacterias
3. 80 millones de bacterias

- Escala de medición: cuantitativa continúa.
 - Unidad de medición: bacterias / ml.

- DEPENDIENTES:

- Catelicidina : LL-37

- Definición conceptual: derivada de la pre-proteína hCAP18, su estructura comienza con dos residuos de leucina y se compone de 37 aminoácidos. Tiene actividad antimicrobiana e inmunomoduladora. Es producida por distintos tipos celulares, incluyendo leucocitos y células epiteliales..
 - Definición operativa: péptido antimicrobiano, que será medido en el sobrenadante de los cultivos de células epiteliales a las

- 24 y 48h, tras la estimulación con VD3, bacterias inactivadas y la combinación de ambos.
 - Escala de medición: cuantitativa continúa.
 - Unidad de medición: μM
- hBD: hBD-2
 - Definición conceptual: péptidos catiónicos con una longitud de 36-42 residuos, sus tres puentes disulfuro están localizados entre cisteínas 1-5, 2-4, 3-6. En general son expresadas en células epiteliales.
 - Definición operativa: péptido antimicrobiano, que será medido en el sobrenadante de los cultivos de células epiteliales a las 24 y 48h, tras la estimulación con VD3, bacterias inactivadas y la combinación de ambos.
 - Escala de medición: cuantitativa continúa.
 - Unidad de medición: μM

DESCRIPCIÓN OPERATIVA

1. Cultivo de células epiteliales.

Se cultivarán células de epitelio pulmonar de la cepa A549, la técnica se describe en el anexo 1.

- ### 2. Se formarán 6 grupos, cada uno con 3 subgrupos por las distintas concentraciones aplicadas. Diferentes cultivos celulares serán sometidos a concentraciones crecientes de VD3, bacterias inactivadas o la combinación de ambas. (Cada experimento se hará por triplicado).

Grupo I: reto con VD3.

Grupo II: reto con Bacterias inactivadas Fórmula 3.

Grupo III: reto con Bacterias Gram (+) inactivadas.

Grupo IV: reto con Bacterias Gram (-) inactivadas.

Grupo V: reto con VD3 + Bacterias inactivadas Fórmula 3.

Grupo VI: control (PBS).

El total de pozos sembrados será de 216. Seis grupos iniciales con 3 subgrupos cada uno =18 pozos. Cada muestra se hará por triplicado, $18 \times 3 = 54$ pozos. Dado que el sobrenadante de cada pozo solo alcanza para hacer una prueba de ELISA por duplicado, se harán ensayos distintos para hBD-2 y LL37, entonces $54 \times 2 = 108$ pozos. De igual forma, dado que el sobrenadante solo alcanza para una sola prueba, se debe hacer el mismo experimento a las 24 y 48h, entonces $108 \text{ pozos} \times 2 = 216$ pozos.

3. La suspensión de Bacterias inactivadas Fórmula 3, así como las bacterias Gram (+) y Gram (-), serán obtenidas de los laboratorios IPI-ASAC.(Ver anexo 2)
4. Medición de catelicidina y hBD: Se realizará por ELISA del sobrenadante del cultivo celular, previamente expuesto a VD3 y bacterias atenuadas. La medición se realizara a las 24 y 48h posteriores a la aplicación del inductor (Ver anexo 3A y 3B para técnica de ELISA y reactivos utilizados en el estudio). El sobrenadante del cultivo celular será liofilizado y posteriormente resuspendido en solución fisiológica, para obtener finalmente un concentrado 5X de la solución original. Ver Anexo 4 para diagrama del estudio.
5. Las anotaciones se harán en el modelo de captación de datos diseñado para el estudio in vitro. (Ver anexo 5)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Análisis intragrupos:

-Análisis antes y después.

- Resultados con distribución paramétrica: t-Student muestras dependientes.
- Resultados sin distribución paramétrica: Pba. de rangos de Wilcoxon.

-Análisis univariado: ANOVA para muestras repetidas.

Análisis entre grupos:

-Análisis antes y después.

- Distribución paramétrica: t-Student muestras independientes.
- Distribución no paramétrica: U-Mann Whitney.

-Análisis univariado: ANOVA de 1 factor muestras independientes.

ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES:

El presente protocolo cumple con los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos propuestos en la declaración de Helsinki de la asociación médica mundial, enmendada por la 52^{va} Asamblea General, Edimburgo, Escocia en Octubre del 2001.

CONFLICTOS DE INTERES:

El presente estudio tiene fines de investigación y enseñanza, no lucrativos. No recibimos apoyo de algún laboratorio o fabricante de los productos que utilizamos en el estudio.

X. ESTUDIO NO.2

Inducción de péptidos antimicrobianos en mucosa nasal, después de la estimulación con bacterias inactivadas y/o VD3

HIPÓTESIS:

La aplicación intranasal de Bacterias atenuadas y VD3 inducirá la producción de hBD-2 y Catelicidina, respectivamente.

OBJETIVOS:

GENERAL

Determinar los niveles de hBD-2 y Catelicidina en el lavado nasal realizado a personas, tras la aplicación intranasal de bacterias atenuadas y VD3.

PARTICULARES

- Determinar el tiempo en el cual se produce la mayor concentración de catelicidina y hBD-2, tras la aplicación del estímulo.
- Identificar si existe un efecto sinérgico entre VD3 y Bacterias atenuadas en la expresión de catelicidina y hBD.
- Identificar posibles efectos secundarios o indeseables tras la aplicación local de bacterias atenuadas y/o VD3.

MATERIAL Y MÉTODOS

TIPO DE ESTUDIO:

Ensayo clínico cruzado.

(Experimental, prospectivo, longitudinal, analítico)

POBLACIÓN DE ESTUDIO:

Voluntarios sanos.

CRITERIOS DE ENTRADA:

- Criterios de inclusión:
 - Mayores de 18 años y menores de 25 años.
 - Género masculino o femenino.
 - Personas que se encuentren al menos 1 mes previo al estudio, sin tratamiento antimicrobiano.
 - Personas que se encuentren al menos 1 mes previo al estudio, sin tratamientos tópicos nasales, principalmente esteroides tópicos nasales, vasoconstrictores o antihistamínicos.
 - Personas que hayan firmado el consentimiento informado.

- Criterios de no inclusión:
 - Personas con enfermedad de tipo inflamatorio que incluya nariz y senos paranasales como: síndrome de SAMTER, rinitis alérgica, rinosinusitis subaguda o crónica, o traumatismo agudo en nariz.
 - Pacientes con proceso neoplásicos identificados en narinas y senos paranasales, incluidos polipos nasales.
 - Personas con enfermedades autoinmunes.
 - Individuos con enfermedades que causen inmunosupresión como Diabetes Mellitus (DM), Cáncer, VIH, Desnutrición
 - Personas que hayan tomado o estén tomando inmunosupresores o esteroides sistémicos, estos últimos al menos 1 mes previo al inicio del estudio.

CRITERIOS DE SALIDA:

- Criterios de exclusión:
 - Personas que no hayan cumplido con la aplicación intranasal del estímulo (bacterias inactivadas y/o VD3) de acuerdo a lo estipulado.
- Criterios de eliminación:
 - Retiro de consentimiento informado.

- Aquellas muestras en las que se halla detectado desarrollo bacteriano en medio de cultivo.

VARIABLES DE ESTUDIO:

- INDEPENDIENTES:

- Bacterias inactivadas.

- Definición conceptual: bacterias sometidas a un proceso de inactivación (calor), que inhibe todo proceso metabólico y por ende su potencial actividad patogénica.
 - IPI-ASAC: fórmula liofilizada Sublingual III, Frasco 2. (*S. Pneumoniae*, *Brahmanela catarrhalis*, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus alfa-hemolítico*, *Streptococcus beta-hemolítico*, *Streptococcus fecales*, *S. epidermidis*, *Bordetella pertussis*, *proteus sp*, *pseudomonas sp*, *E. coli*, *corynebacterium diphteriae*).

Concentración= 2600 millones de bacterias / ml.

Las bacterias inactivadas serán aplicadas intranasalmente, en una concentración de 119 millones de bacterias/ml y un volumen de 0.084ml(10 y 20 millones de bacterias para el grupo de 8 y 48h respectivamente), equivalentes a dos disparos de aplicador intranasal.

- Escala de medición: cuantitativa continúa.
 - Unidad de medición: bacterias / ml.
 - NOTA: el uso de bacterias inactivadas se lleva a cabo desde 1970, existen varios estudios que demuestran su

efectividad y sobre todo su seguridad, tras su administración en el ser humano. Diversos estudios demuestran que los efectos adversos reportados no son mayores al placebo.^{133,134,135} En el Anexo 1 se incluye información sobre la formula bacteriana utilizada en el presente estudio.

- VD3.
 - Definición Conceptual: llamada también colecalciferol, es la forma activa de la vitamina D. Puede obtenerse de la dieta o por la acción de los rayos ultra violeta tipo B (UVB) sobre el 7-dehidrocolesterol en la piel. Inicialmente se identificó su efecto sobre la homeostasis del calcio, pero actualmente se sabe que tiene un papel modulador en el sistema inmune.
 - Definición Operativa: VD3 (Colecalciferol), laboratorios SIGMA. Frasco con 5 g. Se administrará intranasalmente en una concentración de 59.5 µg/ml y un volumen de 0.084ml (200UI).
 - Escala de medición: cuantitativa continúa.
 - Unidad de medición: nm
 - NOTA: La dosis diaria máxima de VD3 sugerida a nivel internacional es de 800 a 1000UI diarias. En el presente estudio se utilizar dosis de 200UI, en un solo día por individuo seleccionado, lo que supone nulos efectos adversos.^{136,137}

VARIABLES DE ESTUDIO:

- DEPENDIENTES:
 - hBD: hBD-2
 - Definición conceptual: péptidos catiónicos con una longitud de 36-42 residuos, sus tres puentes disulfuro están localizados entre cisteínas 1-5, 2-4, 3-6. En general son expresadas en células epiteliales y neutrófilos.
 - Definición operativa: péptido antimicrobiano que será medido en el lavado nasal, obtenido de los sujetos de estudio, tras la estimulación con bacterias inactivadas, VD3 y la combinación de ambos, a las 8 y 48h, dependiendo del grupo de estudio; respetando un periodo de lavado de 15 días entre cada toma.
 - Escala de medición: cuantitativa continúa.
 - Unidad de medición: μM
 - Catelicidina : LL-37
 - Definición conceptual: derivada de la pre-proteína hCAP18, su estructura comienza con dos residuos de leucina y se compone de 37 aminoácidos. Tiene actividad antimicrobiana e inmunomoduladora. Es producida por distintos tipos celulares, incluyendo leucocitos y células epiteliales.
 - Definición operativa: péptido antimicrobiano que será medido en el lavado nasal, obtenido de los sujetos de estudio, tras la estimulación con VD3, bacterias inactivadas y la combinación

de ambos, a las 8 y 48h, dependiendo del grupo de estudio; respetando un periodo de lavado de 15 días entre cada toma.

- Escala de medición: cuantitativa continua.
- Unidad de medición: μM

- **TAMAÑO DE LA MUESTRA:**

$$n = \frac{2s^2(z_{\alpha} + z_{\beta})^2}{d^2}$$

Donde: Z_{α} para estudios a dos colas= 1.96

Z_{β} para potencia de 80% = 0.84

$\sigma = 5.32$, Desviación estándar de hBD-2 en reportado en el estudio de Schaller-Bals.⁹⁰

D= diferencia estimada (6 $\mu\text{g/ml}$)

Sustituyendo los datos en la formula se obtiene un resultado de : 12 pacientes.

*Dado que el diseño del estudio es un Ensayo clínico cruzado, y se harán 2 grupos diferentes, cada grupo tendrá 12 individuos.

DESCRIPCIÓN OPERATIVA

1. Selección de los sujetos de estudio. Aplicación de Criterios de entrada.
Firma de Consentimiento informado (Anexo 6)
2. Los sujetos de estudio serán asignados aleatoriamente a uno de dos grupos:
 - Grupo 1: se le aplicarán los diferentes estímulos y la medición se hará a las 8 h.
 - Grupo 2: se le aplicarán los diferentes estímulos y la medición se hará a las 48 h.
3. Previa examinación clínica, y habiendo descartado cualquier síntoma o signo sugestivo de infección, a todos los sujetos de estudio se les realizará un lavado nasal en condiciones basales con el método modificado de Greiff and Gruenberg^{138,139} (Ver Anexo 7 para descripción de la técnica).
Una vez obtenido el líquido de lavado nasal, la muestra será procesada y será guardada a -70°C, hasta el momento en que vaya a ser analizada.
4. Ni el paciente, ni el médico responsable de hacer el lavado nasal, ni químico encargado de procesar la muestra, sabrán a qué tipo de estímulo fue aplicado previa realización del lavado nasal.
5. El estímulo a aplicar será colocado en frascos con aplicador intranasal, y serán codificados de la siguiente forma:
 - A: VD3.
 - B: Suspensión de bacterias inactivadas F3 (IPI-ASAC).
 - C: VD3 + suspensión de bacterias inactivadas F3 (IPI-ASAC).
 - D: Control, solución fisiológica, tween 0.15%.

6. A cada persona incluida en el estudio se le explicará la técnica de aplicación intranasal del spray. A cada sujeto de estudio se le aplicarán los diferentes estímulos intranasales (A, B, C, ó D); la asignación al tratamiento será aleatoria. Se dejará un periodo de lavado de 15 días, entre cada estímulo. La posología será la siguiente:
 - Grupo 1: la dosis total (10 millones de bacterias, 200 UI de VD3, y la combinación de ambas) se aplicará en una sola toma, y el lavado nasal se realizará a las 8h.
 - Grupo 2: la dosis total (20 millones de bacterias, 400 UI de VD3, y la combinación de ambas) será dividida en 4 tomas, separadas cada una por 12 h, y el lavado nasal se realizará a las 48 h.
7. Una vez obtenido el lavado nasal, este será procesado y posteriormente guardado hasta el momento en que se haga el análisis para detectar los péptidos antimicrobianos. El procesamiento de las muestras incluye: centrifugación, extracción del sobrenadante, liofilización y concentración (10x), reconstitución, y almacenamiento a -70°C . (Ver Anexo 8 para una descripción detallada del proceso).
8. A cada sujeto de estudio se le dará un formato de captación de datos (Anexo 9), previo registro de sus datos personales y antecedentes de importancia. En dicho formato, la persona podrá registrar posibles efectos secundarios tras la aplicación del estímulo intranasal.
9. Las muestras guardadas a -70°C , serán descongeladas, y se les realizará determinación de hBD-2 y LL-37, por el método de ELISA. (Ver Anexo 3A, 3B para descripción de reactivos y técnica de ELISA).

10. Los resultados obtenidos serán capturados y sometidos a análisis estadístico para su ulterior interpretación. (Ver Anexo 10 para diagrama de estudio)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los datos fueron analizados con el programa SPSS versión 13.0. En la estadística descriptiva se utilizarán proporciones para variables cualitativas, así como promedios y desviación estándar para las cuantitativas. Se realizará chi cuadrada (y prueba exacta de Fisher) para encontrar diferencia intra y entre grupos en aquellas variables de tipo cualitativo. Se aplicarán pruebas de normalidad a las variables cuantitativas, y las diferencias intragrupos y entregrupos serán analizadas utilizando pruebas de t y pruebas no paramétricas (Wilcoxon y U de Mann-Whitney) dependiendo del tipo de distribución.

ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES:

Riesgo mayor al mínimo: Se considera dentro de esta clasificación de acuerdo a la ley general de salud, por realizarse en personas sin patología aparente, un procedimiento diferente al habitual, en este caso, la aplicación intranasal del estímulo para inducir la producción endógena de péptidos antimicrobianos. Sin embargo, tal y como se refiere previamente en este documento, tanto las bacterias inactivadas (Formula 3 IPI-ASAC), como la VD3, no han reportado efectos colaterales a las dosis utilizadas, y por ende no comprometen la salud del individuo y mucho menos su vida. Las posibles complicaciones serían suscitadas por la presencia de líquido intranasal, únicamente en personas con tendencia a la

hiperreactividad nasal inespecífica y se manifestarían como sensación de obstrucción nasal, irritación nasal o resequedad intranasal. La maniobra de rescate en caso de presentar alguno de estos síntomas será comunicarlo de inmediato al investigador, y de considerarse necesario se evitaran aplicar futuras dosis. El presente protocolo cumple con los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos propuestos en la declaración de Helsinki de la asociación médica mundial, enmendada por la 52^{va} Asamblea General, Edimburgo, Escocia en Octubre del 2001.

CONFLICTOS DE INTERES:

El presente estudio tiene fines de investigación y enseñanza, no lucrativos. No recibimos apoyo de algún laboratorio o fabricante de los productos que utilizamos en el estudio.

XI. ESTUDIO No. 3

Detección y localización de hBD-2 en biopsias de mucosa nasal tras la estimulación con bacterias inactivadas.

HIPÓTESIS

La estimulación de una biopsia de mucosa nasal con bacterias inactivadas inducirá la producción de hBD-2 en las células epiteliales.

OBJETIVOS:

GENERAL

-Determinar si la estimulación de biopsias de mucosa nasal con bacterias inactivadas, inducen la producción de hBD-2 en las células epiteliales de dicho tejido.

PARTICULARES

-Identificar si en condiciones basales, es posible detectar hBD-2 en biopsias de mucosa nasal.

- Determinar si la producción de hBD-2 se limita al epitelio o se presenta también en otras partes de la mucosa nasal.

MATERIAL Y MÉTODOS

TIPO DE ESTUDIO:

-Investigación básica. (Estudio *in vitro*)

POBLACIÓN DE ESTUDIO:

-Biopsias de mucosa nasal.

VARIABLES DE ESTUDIO:

- INDEPENDIENTES:
 - Bacterias inactivadas.
 - Definición conceptual: bacterias sometidas a un proceso de inactivación (calor), que inhibe todo proceso metabólico y por ende su potencial actividad patogénica.
 - IPI-ASAC: fórmula liofilizada Sublingual III, Frasco 2. (*S. Pneumoniae*, *Brahmanela catarrhalis*, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus alfa-hemolítico*, *Streptococcus beta-hemolítico*, *Streptococcus fecales*, *S. epidermidis*, *Bordetella pertussis*, *proteus sp*, *pseudomonas sp*, *E. coli*, *corynebacterium diphteriae*).
Concentración= 2600 millones de bacterias / ml.
Se aplicarán sobre el cultivo de la biopsia nasal una concentración de 10 millones de bacterias por 48h.
 - Escala de medición: cuantitativa continúa.
 - Unidad de medición: bacterias / ml.

- DEPENDIENTES:
 - hBD: hBD-2
 - Definición conceptual: péptidos catiónicos con una longitud de 36-42 residuos, sus tres puentes disulfuro están localizados entre cisteínas 1-5, 2-4, 3-6. En general son expresadas en células epiteliales.
 - Definición operativa: péptido antimicrobiano, que será detectado mediante la técnica de inmunohistoquímica en el cultivo de la biopsia de mucosa nasal, a las 0 y 48h tras la estimulación con VD3, bacterias inactivadas y la combinación de ambos.
 - Escala de medición: cualitativa nominal dicotómica.
 - Unidad de medición: Sí/No.

El tejido epitelial de nariz será obtenido tras biopsiar a pacientes sometido a rinoseptumplastía funcional en el servicio de Otorrinolaringología del INER.

A continuación se mencionan los criterios de entrada y salida de los pacientes a los que se les realizará la biopsia.

Criterios de entrada:

- Criterios de inclusión:
 - Mayores de 18 años y menores de 60 años.
 - Género masculino o femenino.
 - Individuos que sean sometidos a procedimientos de rinoplastía funcional.

- Pacientes que hayan firmado la hoja de consentimiento informado.
- Criterios de no inclusión:
 - Pacientes con proceso infeccioso al momento de la biopsia, ó quince días antes del estudio.
 - Pacientes con enfermedad de tipo inflamatorio que incluya nariz y senos paranasales como: síndrome de SAMTER, rinosinusitis subaguda o crónica, rinitis alérgica.
 - Pacientes con proceso neoplásicos identificados en narinas y senos paranasales, incluidos polipos nasales.
 - Pacientes que estén con tratamiento tópico nasal o sistémico que incluya esteroides en los últimos 7 días.

Criterios de salida:

- Criterios de eliminación:
 - Retiro de consentimiento informado.

DESCRIPCIÓN OPERATIVA

1. Las biopsias de mucosa nasal serán obtenidas, previo consentimiento informado (Ver anexo 11), en pacientes sometidos a rinoseptumplastía funcional. Los pacientes deberán estar exentos de procesos infecciosos o inflamatorios, así como de atopia, misma que será descartada por medio de pruebas cutáneas.

2. Cada biopsia será dividida en tres porciones iguales. A cada segmento se le realizará el siguiente procedimiento:

-Segmento 1: control tiempo cero. Esta porción será fijada en paraformaldehído inmediatamente después de haber sido tomada.

-Segmento 2: control (solo medio de cultivo)

-Segmento 3: Bacterias inactivadas (10 millones).

3. La suspensión de Bacterias inactivadas Fórmula 3 será obtenida de los laboratorios IPI-ASAC. (Ver anexo 2)

4. Detección de hBD-2: Se realizará por Inmunohistoquímica. Una vez que la biopsia haya sido fijada en paraformaldehído, con o sin estimulación previa, la biopsia será incluida en bloques de parafina y posteriormente se harán cortes del bloque que serán puestos en portaobjetos silanizados para posteriormente realizar la técnica de inmunohistoquímica.(Ver Anexo 12 para técnica de inmunohistoquímica y procesamiento de las muestras)

5. Las anotaciones se harán en el modelo de captación de datos diseñado para el presente estudio. (Ver anexo 13)

ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES:

Riesgo mayor al mínimo: Se considera dentro de esta clasificación de acuerdo a la ley general de salud, por realizarse a los pacientes con septumplastia, un procedimiento diferente al habitual, en este caso la toma de biopsia de mucosa nasal. Sin embargo los efectos colaterales que pudieran ser causados por la toma

de la muestra no comprometen la vida. Dichos efectos colaterales están reportados como sangrado y dolor local. La maniobra de rescate en caso de sangrado consiste en visualización de la hemorragia y cauterización o tamponamiento de la misma. El presente protocolo cumple con los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos propuestos en la declaración de Helsinki de la asociación médica mundial, enmendada por la 52^{va} Asamblea General, Edimburgo, Escocia en Octubre del 2001.

CONFLICTOS DE INTERES:

El presente estudio tiene fines de investigación y enseñanza, no lucrativos. No recibimos apoyo de algún laboratorio o fabricante de los productos que utilizamos en el estudio.

XII. RESULTADOS

RESULTADOS ESTUDIO 1:

El cultivo de células A549 se dividió en 6 grupos diferentes de acuerdo al estímulo aplicado. Se utilizaron cultivos diferentes para obtener el sobrenadante a las 24 y 48 h. También se utilizaron diferentes cultivos para hacer la medición de hBD-2 y la de catelicidina. Cada experimento se hizo por triplicado. En total se sembraron 216 pozos y se realizó igual número de pruebas de ELISA; 108 pruebas de ELISA para detección de hBD-2, y 108 para detección de catelicidina (LL-37). El 100% de las muestras analizadas por ELISA para hBD-2 y LL-37 resultaron negativas. (Ver Cuadro 1)

Cuadro 1. Detección de hBD-2 y LL-37 en el sobrenadante del cultivo de células A-549, sometido a distintos estímulos durante 24 y 48h.

GRUPOS	hBD-2 (24h) n=54		hBD-2 (48h) n=54		LL-37 (24h) n=54		LL-37 (48h) n=54	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
VD3								
-50 UI	-	3	-	3	-	3	-	3
-100 UI	-	3	-	3	-	3	-	3
-200 UI	-	3	-	3	-	3	-	3
F3								
-10 millones	-	3	-	3	-	3	-	3
-20 millones	-	3	-	3	-	3	-	3
-80 millones	-	3	-	3	-	3	-	3
Bacterias Gram (+)								
-10 millones	-	3	-	3	-	3	-	3
-20 millones	-	3	-	3	-	3	-	3
-80 millones	-	3	-	3	-	3	-	3
Bacterias Gram (-)								
-10 millones	-	3	-	3	-	3	-	3
-20 millones	-	3	-	3	-	3	-	3
-80 millones	-	3	-	3	-	3	-	3
VD3 + F3								
-50 UI + 10 millones	-	3	-	3	-	3	-	3
-100 UI + 20 millones	-	3	-	3	-	3	-	3
-200 UI + 80 millones	-	3	-	3	-	3	-	3
Control (PBS) Volumen 1,2 y 3	-	9	-	9	-	9	-	9

VD3: vitamina D3; F3: fórmula bacteriana 3 de IPI ASAC; PBS: phosphate buffered saline.

RESULTADOS ESTUDIO 2:

Se incluyeron en el estudio 24 voluntarios sanos. Aleatoriamente se asignaron a uno de dos grupos; el grupo 1, al cual se le aplicó el estímulo en una sola dosis y se hizo el lavado nasal a las 8h, y el grupo 2 al cual se le administró el doble de la dosis en comparación al grupo 1, misma que se dividió en 4 tomas aplicando cada una con 12h de diferencia, y se realizó el lavado a las 48 h. A cada individuo incluido en alguno de los dos grupos se le hicieron 5 lavados en total, un lavado en condiciones basales, uno posterior a la aplicación de estímulo “A” (VD3), uno posterior a la aplicación de estímulo “B” (bacterias inactivadas), una posterior a estímulo “C” (bacterias inactivadas + VD3), y un último posterior a la aplicación intranasal del estímulo “D” (placebo). En el Cuadro 2 se presentan las características generales de los dos grupos de estudio.

En cuanto a la detección de hBD-2, en el grupo de 8h no se detectó este péptido en el lavado inicial (T0), ni en el lavado posterior a la administración del estímulo “A”, el “C” o el “D”. Únicamente se detectó hBD-2 en un individuo del grupo (8.3%) al cual se le hizo el lavado posterior a la administración de bacterias inactivadas (estímulo “B”). Ver cuadro 3

Por otra parte, en el grupo de 48 h se detectó hBD-2 en el 58.3% (7 de 12 individuos) de aquellos que recibieron el estímulo “B” o bacterias inactivadas, y en el 66.6% de los que recibieron el estímulo “C” o bacterias inactivadas + VD3.(Ver cuadro 4) La media de hBD-2 fue de 4668.99 ± 2829.33 pg/ml cuando a los sujetos de estudio se les administro intranasalmente bacterias inactivadas, y fue de

3894.37±2074.30 pg/ml, cuando a este mismo grupo se les aplicó el estímulo “C” o la combinación de bacterias inactivadas y VD3. No se detectó hBD-2 en los individuos de este grupo de estudio cuando se les hizo el lavado nasal en condiciones basales, o cuando recibieron el estímulo “A”. Solamente a un individuo (8.3%) se le detectó hBD-2, después de aplicársele el estímulo “D” o placebo. (Ver figura 1)

Solamente en 5 voluntarios del grupo 2 fue posible detectar hBD-2 después de la aplicación tanto del estímulo “B”, como del estímulo “C”. Los valores de hBD-2 reportados fueron de 3630.349 pg/ml después de aplicar el estímulo “B”, y de 4789.175 pg/ml en los mismos individuos posterior a la aplicación del estímulo “C” (p=0.013). Ver figura 2

En cuanto a los efectos secundarios reportados después de la administración de los diferentes estímulos, la proporción de individuos que refirió molestias varió del 16.7% al 33%; sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar los efectos reportados entre el grupo 1 y el grupo 2. (Ver cuadro 5) El principal síntoma secundario reportado por los sujetos de estudio fue la obstrucción nasal. Solamente un individuo en el grupo de 8h refirió rinorrea después de aplicarse el estímulo “D”, otro voluntario del grupo de 48h refirió ardor posterior a la aplicación del estímulo “B”, y uno más del grupo de 8h presentó ardor y resequedad después de la aplicación del estímulo “C”. Ningún individuo reportó fiebre.

Cuadro 2. Características generales de los pacientes de estudio 2.

	GRUPO 1 (8h) n=12	GRUPO 2 (48h) n=12
Edad	20.92±.515	20.83±.389
Género (M/F)	4/8	5/7
Antecedentes de tabaquismo	3	1
IVRS/año	2.17±.937	2.08±.996

IVRS: infecciones de vías respiratorias superiores.

Cuadro 3. Valores de hBD-2 (pg/ml) en lavados nasales realizados a las 8h, de individuos sometidos a diferentes estímulos.

FOLIO	GRUPO	BASAL (T0)	ESTÍMULO "A"	ESTÍMULO "B"	ESTÍMULO "C"	ESTÍMULO "D"
1	8h	0	0	6008.827	0	0
2	8h	0	0	0	0	0
3	8h	0	0	0	0	0
4	8h	0	0	0	0	0
5	8h	0	0	0	0	0
6	8h	0	0	0	0	0
7	8h	0	0	0	0	0
8	8h	0	0	0	0	0
9	8h	0	0	0	0	0
10	8h	0	0	0	0	0
11	8h	0	0	0	0	0
12	8h	0	0	0	0	0

Basal: lavado inicial, sin ningún estímulo.

Estímulo "A": VD3 (200 UI)

Estímulo "B": Bacterias inactivadas (10 millones).

Estímulo "C": Bacterias inactivadas (10 millones) + VD3 (200 UI)

Estímulo "D": Placebo (solución fisiológica).

Las dosis fueron administradas en una sola aplicación.

Cuadro 4. Valores de hBD-2 (pg/ml) en lavados nasales realizados a las 48h, de individuos sometidos a diferentes estímulos.

FOLIO	GRUPO	BASAL (T0)	ESTÍMULO “A”	ESTÍMULO “B”	ESTÍMULO “C”	ESTÍMULO “D”
13	48h	0	0	0	0	0
14	48h	0	0	1505.331	3031.431	2639.071
15	48h	0	0	6712.075	8238.131	0
16	48h	0	0	9689.422	0	0
17	48h	0	0	0	1460.445	0
18	48h	0	0	4841.807	0	0
19	48h	0	0	0	0	0
20	48h	0	0	4632.341	4876.548	0
21	48h	0	0	0	1999.068	0
22	48h	0	0	0	3749.598	0
23	48h	0	0	3134.352	3947.361	0
24	48h	0	0	2167.648	3852.402	0

Basal: lavado inicial, sin ningún estímulo.

Estímulo “A”: VD3 (400 UI)

Estímulo “B”: Bacterias inactivadas (20 millones).

Estímulo “C”: Bacterias inactivadas (20 millones) + VD3 (400 UI)

Estímulo “D”: Placebo (solución fisiológica).

Las dosis fueron divididas en cuatro, y administradas con un tiempo de 12h entre cada dosis.

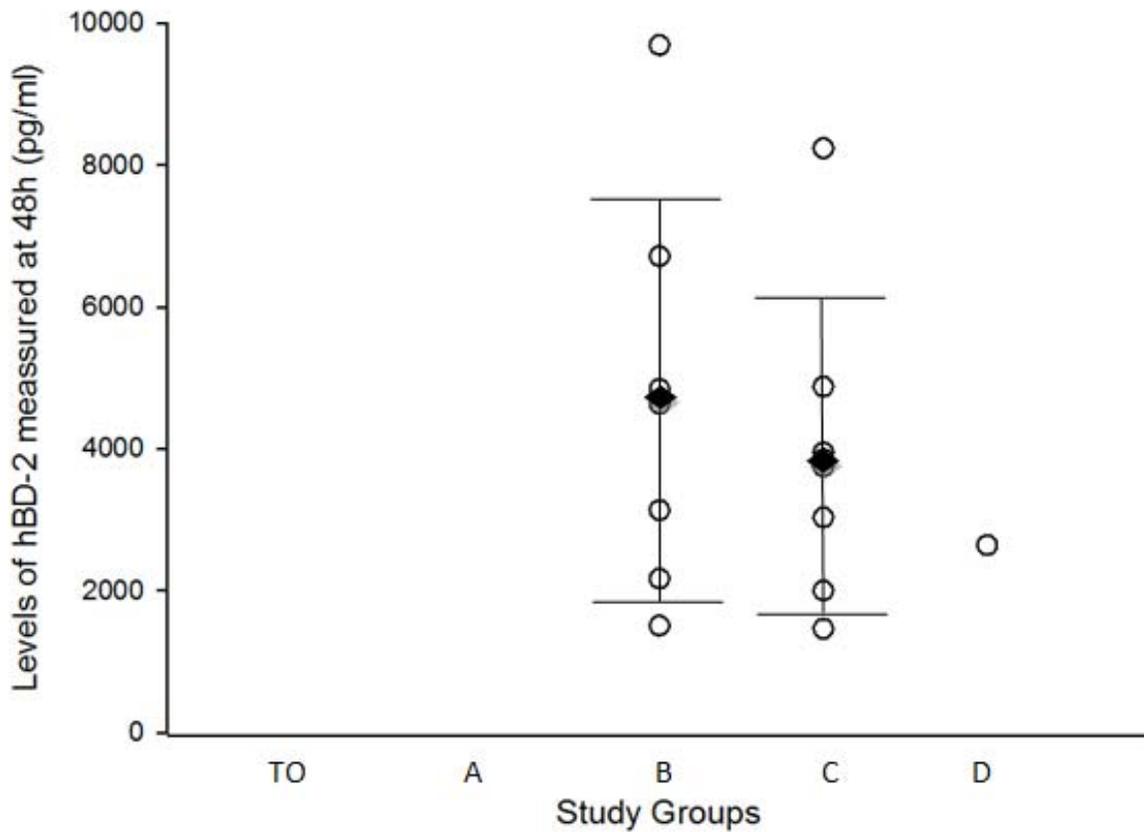


Figura 1. Detección de hBD-2 por la técnica de ELISA en lavados nasales, a las 48h de aplicar distintos estímulos intranasales en un mismo grupo de individuos. T0= lavado en condiciones basales; “A”: vitamina D3 (400UI); “B”: bacterias inactivadas (Fórmula 3 IPI ASAC 20 millones); “C”: bacterias inactivadas (Fórmula 3 IPI ASAC 20 millones) + vitamina D3 (400UI); “D”: placebo (Solución fisiológica). El total de la dosis intranasal fue dividido en 4, y cada dosis se aplicó con 12 h de diferencia entre una y otra.

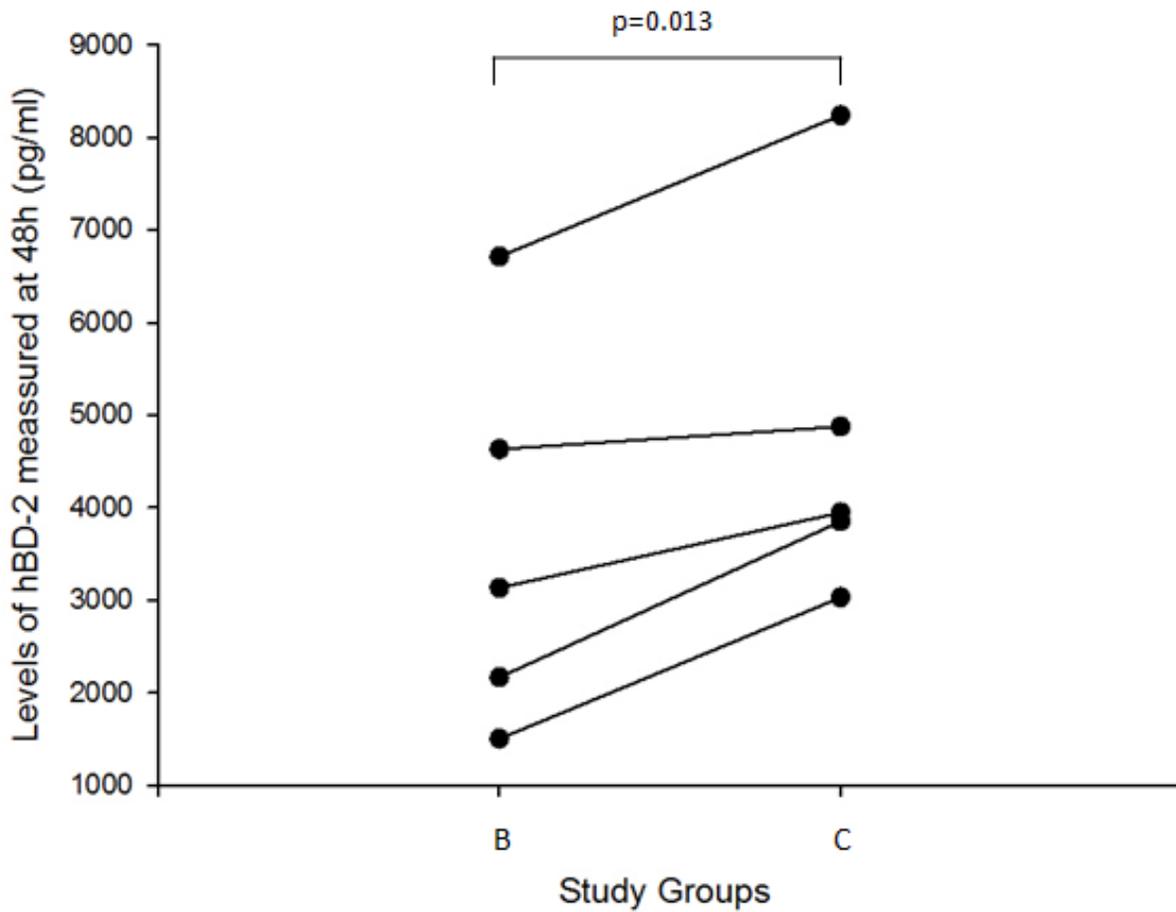


Figura 2. Detección de hBD-2 por la técnica de ELISA en lavados nasales, a las 48h de aplicar dos estímulos intranasales distintos, en los mismos individuos. “B”: bacterias inactivadas (Fórmula 3 IPI ASAC 20 millones); “C”: bacterias inactivadas (Fórmula 3 IPI ASAC 20 millones) + vitamina D3 (400UI). El total de la dosis intranasal fue dividido en 4, y cada dosis se aplicó con 12 h de diferencia entre una y otra.

Cuadro 5. Efectos secundarios reportados después de la aplicación intranasal de distintos estímulos, previo a la realización del lavado nasal para detectar hBD-2.

Estímulo	Grupo 8h n=12	Grupo 48h n=12	Valor de p= *
A	2(16.7%)	3(25%)	NS
B	3(25%)	3(25%)	NS
C	3(25%)	4(33%)	NS
D	2(16.7%)	4(33%)	NS

*Prueba exacta de Fisher.

“A”: vitamina D3;

“B”: bacterias inactivadas;

“C”: bacterias inactivadas;

“D”: placebo (Solución fisiológica).

RESULTADOS ESTUDIO 3:

Se obtuvieron 10 biopsias de mucosa nasal de cornete medio, de 10 distintos pacientes que fueron sometidos a cirugía de rinoseptoplastia funcional previo consentimiento informado. De los pacientes 6 fueron mujeres y 4 hombres, con un rango de edad de 20 a 34 años. No se reportaron complicaciones durante ni posterior a la toma de las muestras. Como se comentó previamente, cada una de las biopsias se dividió en 3 segmentos. El primer segmento se fijó en paraformaldehído y después de incluirlo en parafina, inmediatamente después de ser tomado por biopsia. El segmento dos se cultivó por 48 h sin ningún estímulo, y el segmento tres se cultivó por 48 h con bacterias inactivadas, para después ser fijados en paraformaldehídos e incluidos en parafina. Se procesaron las 10 biopsias y cada uno de los segmentos por la técnica de inmunohistoquímica (Anexo XII). En condiciones basales y después de 48 h de cultivo sin estímulo, el 40% de las biopsias (4 de 10) mostraron inmunotinción positiva para hBD-2. Sin embargo, en el 100 % de las biopsias tras 48 h de cultivo con bacterias inactivadas (1×10^7), se detectó una inmunotinción positiva para hBD-2. De manera característica, la inmunoreactividad fue localizada predominantemente hacia el epitelio nasal. (Ver Cuadro 6 y Figura 3 y 4)

Cuadro 6. Detección de hBD-2 en biopsias de mucosa nasal, por técnica de inmunohistoquímica, después del cultivo con bacterias inactivadas por 48 h

No. BIOPSIA	ESTÍMULO	TIEMPO	hBD-2 (+) ó (-)
CULTIVO			
1,3,6,7	Condiciones basales	0 h	+
	Sin estímulo	48h	+
	Bacterias inactivadas	48h	+
2, 4, 5, 8, 9, 10	Condiciones basales	0 h	-
	Sin estímulo	48h	-
	Bacterias inactivadas	48h	+

Condiciones basales= biopsia fijada en paraformaldehido inmediatamente después del procedimiento quirúrgico.

Sin estímulo = biopsias cultivadas en MEM, sin estímulo bacteriano.

Bacterias inactivadas= fórmula bacteriana de IPI ASAC (1×10^7)

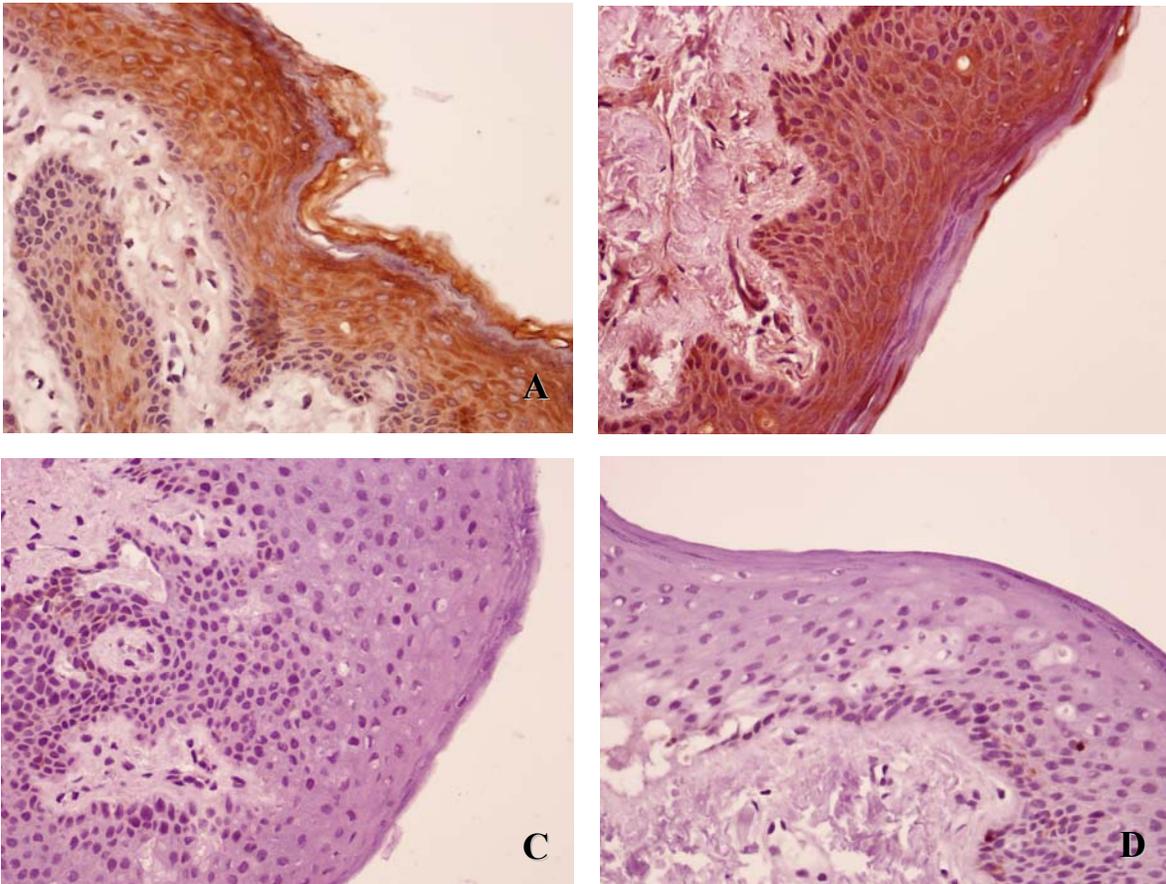


Figure 3. Biopsias nasales procesadas por inmunohistoquímica. Inmunotinción positiva para hBD-2 después de 48 h de cultivo y estimulación con bacterias inactivadas en dos muestras diferentes (A y B). Inmunotinción negativa para hBD-2 después de 48 h de cultivo, sin ningún agente estimulante (C). Sección de biopsia nasal procesada en la ausencia de anticuerpo primario, control negativo (D). Aumento original 400X.

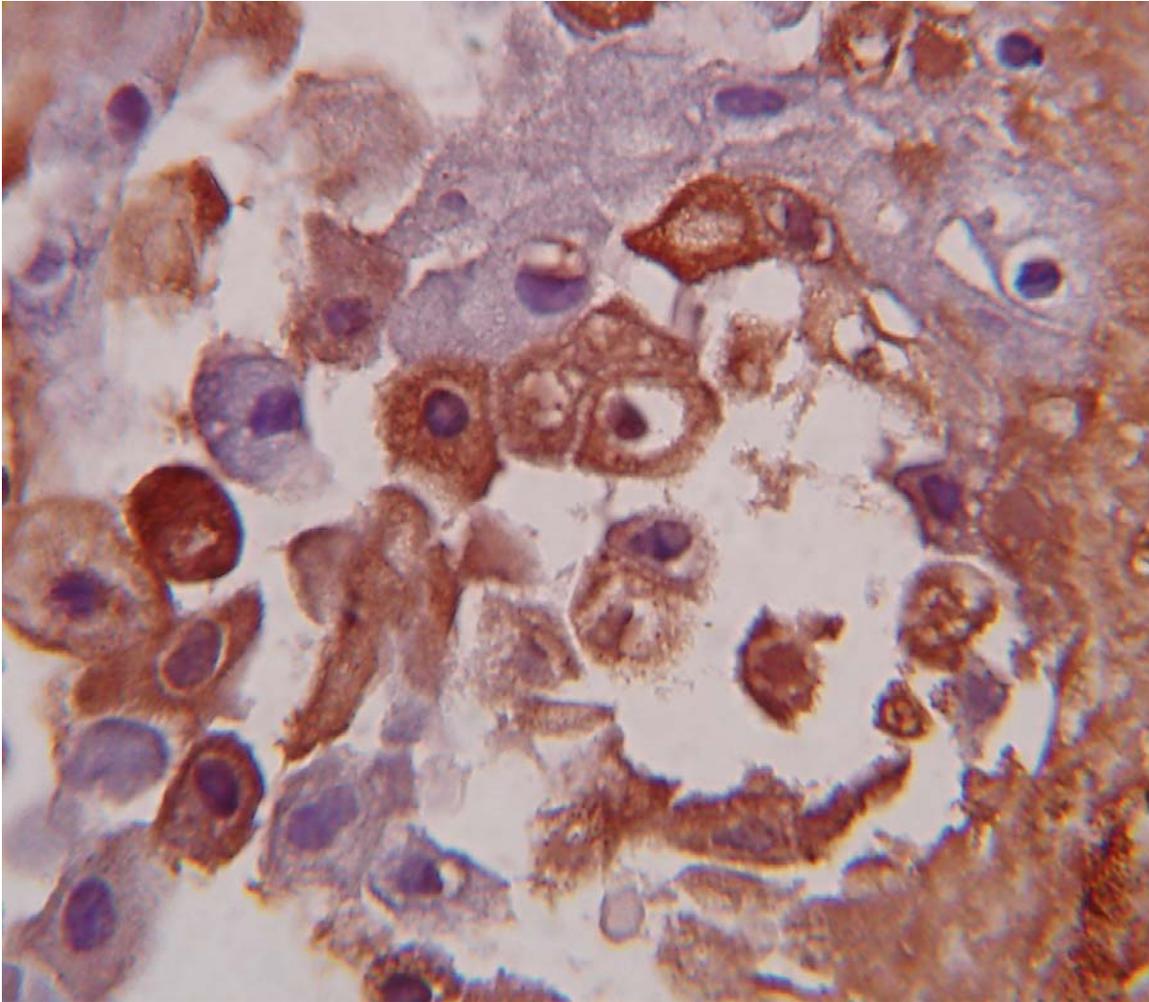


Fig. 4. Inmunotinción positiva para hBD-2 después, en biopsia de mucosa nasal, a las 48 h de cultivo y estimulación con bacterias inactivadas. Aumento original 1000X.

XIII. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN ESTUDIO 1:

En este primer estudio, nos propusimos obtener varios datos de un *modelo in vitro* para utilizarlos posteriormente en un modelo *in vivo*. La originalidad de este estudio *in vitro* estribaba en la aplicación de diferentes tipos y concentraciones de bacterias inactivadas y VD3 para inducir la producción de PAMs en células epiteliales bronquiales. Se inició con cultivo de células epiteliales A-549 (adenocarcinoma bronquial) por su disponibilidad, facilidad de cultivo, y debido a que han servido de modelo en distintos estudios. Otra característica original de este estudio fue el hacer la detección de los PAMs por la técnica de ELISA. Sin embargo, los resultados para la detección de hBD-2 y LL-37 fueron negativos.

Distintos factores pudieron influir en el resultado negativo, entre ellos: la técnica utilizada para medir los PAM (ELISA), y el hecho de que el cultivo de células A549 no representa por completo los eventos que pueden ocurrir en un modelo *in vivo*, en donde la participación de otras células, como monocitos y linfocitos, puede ser fundamental.

Con respecto a la técnica empleada para detectar los PAM, primero debemos hacer hincapié en que la hBD-2 puede ser producida en el epitelio bronquial tras el contacto con microorganismos, y en particular con lipopolisacáridos y péptidoglicanos.^{27,109,110} La producción de LL-37 está más regulada, y depende del microambiente.⁴⁵ La catelicidina es producida principalmente en keratinocitos, monocitos y neutrófilos;^{68,69} se ha demostrado que el epitelio bronquial puede

producirla, aunque en menor proporción¹⁴⁰. Sin embargo, en todos estos experimentos las técnicas utilizadas para detectar a estos PAMs fueron PCR, inmunohistoquímica y Western blot. En ningún estudio se había reportado si se podía medir la concentración de PAM por medio de ELISA en el sobrenadante del cultivo celular. Dado que la función antimicrobiana de estos péptidos se ejerce entre los 10 y 31 µg/ml para LL-37,^{16,87} y entre los 5 y 18 µg/ml para hBD-2,²⁷ nosotros decidimos utilizar la técnica de ELISA para detectar si estos péptidos alcanzan dicha concentración, pues como comentamos previamente, nuestro objetivo final era aplicar el estímulo a personas para inducir la producción de péptidos y así prevenir y combatir procesos infecciosos de las vías respiratorias. En teoría de poco serviría inducir la producción de genes, si no se logran concentraciones adecuadas de dichos péptidos para que logren su efecto biológico. A pesar de que el sobrenadante del cultivo celular se concentró 5X, no se pudo detectar hBD-2 ni LL-37 por la técnica de ELISA. La concentración mínima detectable de la técnica de ELISA para hBD-2 fue de 8 pg/ml, y la de catelicidina fue de 0.14 ng/ml. Dadas las condiciones del experimento, aún si se produjeron PAM estos habrían sido en tan poca cantidad que no pudieron ser detectados por nuestra técnica, y por ende, su efecto biológico sería muy discutido.

Con respecto a hBD-2, otra causa que pudo haber ocasionado el resultado negativo es el hecho de que en algunos experimentos *in vitro*, la estimulación de células epiteliales por moléculas derivadas de microorganismos es muy pobre, y sólo se incrementa cuando además de dichas moléculas se agregan al cultivo celular, linfocitos y monocitos previamente expuestos a microorganismos. Este efecto está asociado a la producción de interleucina 1 (IL-1) por los monocitos y

linfocitos.¹⁴¹ Una posible alternativa en nuestro experimento hubiese sido agregar a los cultivos dicha interleucina; sin embargo, estaríamos repitiendo experimentos hechos con anterioridad, y además no nos sería de utilidad para nuestro objetivo último, que es llevar el modelo a estudios *in vivo*, pues no sería ética la administración de IL-1 a una persona para inducir la producción de PAM.

En cuanto a LL-37, debemos comentar que otra causa que afectó el experimento y que ocasionó que el resultado fuese negativo, es el hecho de que dicho péptido es principalmente producido, hablando del microambiente del pulmón, por macrófagos alveolares y en menor grado por las células epiteliales.¹⁴⁰ Nuestro experimento fue hecho únicamente con células epiteliales A-549, que además son células inmortales de adenocarcinoma, y no reflejan estrictamente lo que sucede *in vivo*. Por otra parte, no en todos los estudios ha sido posible demostrar que LL-37 es producida en células epiteliales bronquiales. Un estudio en el cual se cultivaron células de epitelio bronquial, y fueron estimuladas con *P. aeruginosa* inactivada por calor, fue negativo el resultado para detección de LL-37 por PCR.¹⁴² Con respecto a este estudio, se podría argumentar que la *P. aeruginosa* no fue el estímulo adecuado para inducir LL-37, por tal motivo además de bacterias, decidimos utilizar VD3, ante el hallazgo reciente de que esta hormona puede inducir la producción de LL-37 principalmente en keratinocitos, pero también en células Calu-3, que son células epiteliales de vías aéreas derivadas de cánceres pulmonares.⁶⁹ Una vez más el resultado fue negativo para detectar catelicidina por medio de ELISA, en niveles cercanos a los que ejerce su efecto antimicrobiano.

Hasta este punto, la investigación *in vitro* podría haberse continuado, solo si se propusiera la toma de biopsias en voluntarios sanos, para reflejar hallazgos un poco más cercanos a lo que sucede *in vivo*. Mejor aún habría sido el aplicar los estímulos estudiados (bacterias inactivadas y VD3) a voluntarios sanos, y posteriormente por medio de biopsias y lavado bronquioalveolar detectar los PAMs. Sin embargo, dado que hasta este momento contábamos con poca evidencia para proponer un estudio con este grado de invasión, y que además pudiera ser considerado como riesgoso y poco ético, decidimos continuar nuestra investigación con otro modelo *in vivo*, un modelo nasal.

El hecho de que los estímulos aplicados (bacterias inactivadas y VD3) han sido previamente utilizados en medicina y tienen un perfil de efectos secundarios bajos, aunado al hecho de que el modelo nasal es poco invasivo, harían más factible y viable la realización del estudio nasal *in vivo*, en comparación con otro modelo de estudio en pulmón. Por estos motivos antes de continuar la investigación en epitelio bronquial diseñamos el estudio 2: “Inducción de péptidos antimicrobianos en mucosa nasal”.

DISCUSIÓN ESTUDIO 2:

En el presente estudio decidimos realizar un reto nasal *in vivo*, aplicando bacterias inactivadas, VD3, o la combinación de ambas a voluntarios sanos. Se decidió realizar la medición de hBD-2 a las 8h en el primer grupo, y a las 48 h en el segundo grupo, pues análisis *in vitro* previos habían demostrado que la expresión de los PAM puede inducirse desde las 8h hasta las 48h tras la estimulación.⁶⁹

En el grupo de 8h, pudimos evidenciar que la detección de hBD-2 y LL-37 en el lavado, fue negativo para todos los estímulos, excepto en el caso de un solo individuo que resultó positivo para hBD-2 tras la administración intranasal de bacterias inactivadas. Entre las causas que pudieron ocasionar el resultado negativo en la detección de hBD-2 están: el momento en el cual se hizo el lavado nasal (8h), la dosis total aplicada, y la frecuencia de administración del estímulo.

Se decidió hacer el lavado nasal a las 8h, porque como comentamos previamente, hay evidencia que indica que la expresión de los genes *camp* (VD3), y *defB2* (hBD-2) se produce de manera importante desde las primeras 8h de ser estimuladas con VD3 e IL-1 respectivamente.⁶⁹ Sin embargo, podría ser que *in vivo*, para alcanzar concentraciones detectables por medio de ELISA, se requiera más tiempo, quizás 24 a 48h. Por otra parte, el hecho de que un individuo haya resultado positivo para la detección de hBD-2 nos hace plantearnos la posibilidad de que existan sujetos más sensibles a los estímulos aplicados, en este caso a las bacterias inactivadas. Más aún, podría ser que se produzca una concentración detectable de hBD-2 a las 8 h, pero con un estímulo más potente, como podría ser

el incremento en la dosis total de bacterias inactivadas. En el presente estudio aplicamos 10 millones de bacterias inactivadas en una sola dosis, no quisimos incrementar más la dosis, pues la experiencia clínica nos ha mostrado que dosis mayores a esta, si bien es raro, pueden llegar a producir fiebre en ciertos individuos.

Otro factor a tomar en cuenta es la frecuencia de administración del estímulo. Par entender la importancia de esta variable, debemos hacer notar que además del tamaño del inóculo (en nuestro estudio sería el total de la dosis), para que un microorganismo pueda ser reconocido por el sistema de defefensa, requiere cierto tiempo de contacto con el epitelio. Dado que las bacterias han sido inactivadas, pierden virulencia y por ende adhesión al epitelio. Aunado a esto hay que recordar que la mucosa nasal tiene células ciliadas que se encargan de movilizar todas las partículas que entran a la nariz, incluido el moco, y por supuesto nuestro estímulo. Por ello una mayor frecuencia en la aplicación del estímulo supondría un mayor éxito en la producción de PAM's.

Con el razonamiento anterior, emprendimos el siguiente estudio en el grupo de 48 h, donde se aplicó el doble de la dosis en comparación al grupo 1, 20 millones de bacterias y 400 UI de VD3. Para disminuir los posibles efectos secundarios, y además incrementar el tiempo de exposición del epitelio al estímulo, dividimos la dosis total en 4 aplicaciones, que serían administradas con espacio de 12 h entre cada una.

De esta forma obtuvimos resultados positivos para hBD-2 en el grupo 2, tras la estimulación con bacterias inactivadas (Estímulo B) y tras la combinación de

bacterias inactivadas y VD3 (Estímulo C). Cuando se aplicó el estímulo B en el grupo de individuos, resultaron positivos para hBD-2 el 58.3%, y cuando se les administró el estímulo C, resultaron positivos para el mismo péptido el 66.6%, lo cual contrasta con los resultados obtenidos en el grupo 1, en quienes se obtuvo resultado positivo para hBD-2 en el 8.3% y 0%, tras la aplicación del estímulo B y el C respectivamente. Esto sugiere que tanto la dosis total, como la frecuencia y el tiempo de aplicación, influyen en la producción de los PAM's.

Dentro de las hipótesis planteadas inicialmente, nosotros proponíamos que la combinación de bacterias inactivadas y VD3 podría incrementar la producción de hBD-2, basándonos en resultados de estudios *in vitro*. Sin embargo, cuando comparamos las medias de los valores obtenidos para hBD-2 en los individuos del grupo 2, tras la aplicación del estímulo B y el C, encontramos niveles más altos de hBD-2 cuando los individuos fueron expuestos al estímulo B (4668.99 ± 2829.33 pg/ml vs 3894.37 ± 2074.30 pg/ml), ver Figura 1. Para encontrar un resultado con significancia estadística, aplicamos una prueba de T para grupos dependientes. Solo 5 individuos dieron positivos para hBD-2 cuando se les aplicó el estímulo B y el estímulo C. Es por demás interesante el comentar que cuando se hizo este análisis por separado, se pudo evidenciar que prácticamente en todos los individuos, los niveles de hBD-2 se incrementaron cuando se les aplicó la combinación de bacterias inactivadas + VD3 (Estímulo C), en comparación los niveles obtenidos en ellos mismos cuando solo se les aplicó bacterias inactivadas (Estímulo B). Se obtuvo además una diferencia estadísticamente significativa con un valor de p de 0.013. (Ver figura 2). Este hallazgo concuerda con lo reportado por Wang et al,⁶⁹ en donde demuestra que la administración de pequeñas

cantidades de VD3 (1nM) aunado a la aplicación de IL-1 (50ng/ml) en un cultivo de células SCC25, pueden incrementar la expresión del gen *defB2* que codifica para hBD-2, en mayor proporción que la administración de IL-1 sola. Si bien en nuestro experimento no administramos IL-1 a nuestros pacientes por razones éticas, como se comentó previamente, la exposición de los monocitos y los linfocitos a las bacterias inactivadas podría inducir la producción de IL-1, tal y como lo sugieren algunos experimentos in vitro.¹⁴¹ Otra evidencia indirecta del posible efecto de la VD3 en el incremento de los valores de hBD-2 cuando se administró junto con bacterias inactivadas podría estar asociada al hallazgo reportado por Schaubert et al.¹⁴³ En dicho estudio ellos evidencian que la estimulación de keratinocitos con VD3 (100nM) indujo la expresión de mRNA de TLR2 y CD14. Si la VD3 pudiera ocasionar un efecto similar en las células de epitelio nasal, el incremento de TLR2 y CD14, se traduciría en un mayor reconocimiento de peptidoglicanos bacterianos, que a su vez produciría un incremento en los niveles de hBD-2. Por supuesto futuros estudios serán necesarios para corroborar dicho hallazgo, pues debido al diseño del estudio podría tratarse de un efecto “aditivo”, sin embargo esto es poco probable dado el tiempo de lavado entre la aplicación de cada estímulo (15 días). El hecho de que solo se halla detectado hBD-2 en un individuo después de la administración del estímulo D (placebo) también descarta, desde nuestro punto de vista, el mencionado efecto aditivo. Cabe resaltar, que el único individuo que resultó positivo para hBD-2 tras el estímulo D, presentó un cuadro gripal 2 días después del lavado nasal, lo cual podría explicar la elevación del PAM.

En cuanto a Catelicidina, el resultado negativo tras la aplicación de los diferentes estímulos en los dos grupos, nos confirma lo comentado con anterioridad, la regulación de LL-37 es específica del microambiente,⁴⁵ pues aún cuando en la piel este péptido es producido en los keratinocitos tras ser estimulados con VD3,⁶⁹ en otros sitios como en el colon es producida solo tras la estimulación con butirato.⁷⁰ Ciertamente, en el epitelio de la mucosa nasal el estímulo con VD3 no fue capaz de inducir la producción de LL-37, al menos en un nivel detectable por la prueba de ELISA. Tampoco la administración de la mezcla de bacterias inactivadas, gram positivas y negativas, fue capaz de inducir su producción a niveles detectables. Quizás la administración de concentraciones más altas de bacterias, principalmente gram positivas, así como un mayor tiempo de estimulación podrían propiciar la producción de LL-37. Futuros estudios serán necesarios para identificar el estímulo más potente en la producción de catelicidina.

La detección de hBD-2 a niveles muy semejantes a los necesarios para ejercer su efecto antimicrobiano,²⁷ nos abren un panorama muy amplio en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para prevenir y tratar procesos infecciosos de las vías respiratorias superiores.

DISCUSIÓN ESTUDIO 3:

Para investigar si la hBD-2 que detectamos en los lavados nasales tenía como origen las células epiteliales, realizamos una tinción por inmunohistoquímica en biopsias nasales obtenidas de sujetos que fueron sometidos a rinoseptumplastía por obstrucción nasal. La inmunorreactividad a hBD-2 fue localizada primordialmente hacia el epitelio, corroborando así, que las células epiteliales son las productoras de hBD-2, tal y como se describe en la literatura.⁵⁶⁻⁵⁹ De manera característica, detectamos una inmunotinción positiva para hBD-2 en el 40% de las biopsias en condiciones basales, es decir, aquellas que fueron procesadas inmediatamente después del tiempo quirúrgico, sin tiempo de cultivo, y obviamente sin estímulo alguno. Este hallazgo es semejante al reportado en un estudio previo por Chen y Fang, en el cual ellos encontraron tinción positiva para hBD-2 en el 25% de las biopsias nasales, procesadas de inmediato al terminar el acto quirúrgico.¹⁴⁴ El hecho de que en nuestro estudio, el porcentaje haya sido discretamente mayor, podría ser debido a que se utilizaron diferentes anticuerpos en las técnicas de inmunohistoquímica. Es importante mencionar que si bien los sujetos a los cuales se les practicó la biopsia no presentaban datos de proceso infeccioso, tenían pruebas cutáneas negativas para alergia y se había descartado cualquier otra comorbilidad, fueron sometidos en su mayoría a procedimiento quirúrgico por presentar obstrucción nasal debido a un proceso de rinitis vasomotora o idiopática. El término de Rinitis denota inflamación de la nariz, por lo que no es de extrañar que estos péptidos se encuentren en la mucosa de algunos de estos pacientes, pues como ya se había comentado su función no es

únicamente antimicrobiana, sino que tienen múltiples efectos que denominamos pleyotrópicos.¹⁴⁵ De hecho, en el mismo estudio reportado por Chang y Fang¹⁴⁴, encontraron la presencia de hBD-2 en el 83% de las biopsias de pólipos nasales, patología que se ha asociado a un proceso inflamatorio importante. Así pues, su presencia también podría estar en relación directa con un proceso de reepitelización tisular, como ha sido demostrado en otros estudios, en los cuales se ha encontrado un incremento dramático en la producción de hBD-2 y LL-37 en los bordes de una herida, posterior a una lesión.¹⁴⁶⁻¹⁴⁷

Por supuesto, el hallazgo de mayor relevancia para el presente estudio, fue el demostrar que estimulando las biopsias nasales con bacterias inactivadas indujo una fuerte tinción para hBD-2 en todas las biopsias, lo cual confirma los hallazgos obtenidos en estudio *in vivo* de reto nasal y lavados nasales. Como comentamos ya en la discusión del estudio 2, con los estudios que realizamos, no investigamos directamente los mecanismos por los cuales los extractos bacterianos inducen la producción de hBD-2 *in vivo*. Sin embargo, está bien establecido que varias moléculas bacterianas, incluyendo los proteoglicanos, los LPS, y el LTA, pueden inducir la producción de hBD-2 interactuando con los receptores tipo “toll” (TLRs).^{73,75} En estudios previos se logró demostrar que los productos bacterianos SpeB (una cistein proteasa del *Streptococcus pyogenes*), LPS de *Escherichia Coli*, y péptidoglicanos de *Staphylococcus aureus*, indujeron la expresión de hBD-2 en epidermis humana.¹⁴¹ Por estas razones, nosotros formulamos la hipótesis de que las moléculas presentes en las bacterias inactivadas pudieron haber estimulado a los TLRs, induciendo así la producción local de hBD-2.

XIV. CONCLUSIONES

La hBD-2 puede ser inducida en el epitelio nasal, tras la estimulación con bacterias inactivadas. El colecalciferol podría tener un efecto sinérgico con las bacterias inactivadas, en la producción de hBD-2, al menos en el epitelio nasal. La estimulación de la inmunidad innata para producir hBD-2, podría ser utilizada para prevenir e inclusive tratar infecciones causadas por patógenos respiratorios.

XV. REFERENCIAS

1. Boman HG. Innate immunity and the normal microflora. *Immunol Rev* 2000; 173:5-16.
2. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002; 415:398-385.
3. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005;3:238-250.
4. Zaiou M, Gallo RL. Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. *J Mol Med* 2002;80:549-561.
5. Hancock REW, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* 8:402-410.
6. Bulet P, Stocklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 2004;198:169-184.
7. Boman HG. Innate immunity and the normal microflora. *Immunol Rev* 2000; 173:5-16
8. Gennaro R, Zanetti M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* 2000; 55:31-49.
9. Lehrer RI, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense. *Curr Opin Immunol* 1999;11:23-27.
10. Zasloff M. Defending the epithelium. *Nat Med* 2006;12:607-608.
11. Rosenfeld Y, Papo N, Shai Y. Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. *J Biol Chem* 2006;281:1636–1643
12. Ciornei CD, Sigurdardóttir T, Schmidtchen A, Bodelsson M. Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2845-2850.
13. Hoover DM, Boulegue C, Yang D, Oppenheim JJ, Tucker KD, Lu W, Lubkowski J. The structure of human MIP-3/CCL20: linking antimicrobial and CCR6

- receptor binding activities with human β -defensins. *J Biol Chem* 2002;277:37647-37654.
14. Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol* 2002;23:291-296.
 15. Bals R, Wilson JM. Cathelicidins a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:711-720.
 16. Dorschner RA, Pestonjamas VK, Tamakuwala S, Ohtake T, Rudisill J, Nizet V, Agerberth B, Gudmundsson GH, Gallo RL. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin antimicrobial peptides active against group A *Streptococcus*. *J Invest Dermatol* 2001;117:91-97.
 17. Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, Weber G, Sorensen O, Borregaard N, Stahle-Backdahl M. The cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J Invest Dermatol* 2003;120:379-389.
 18. Hutmark D. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr Opin Immunol* 2003;15:12-9.
 19. Clarke DJ, Campopiano DJ. Antimicrobial peptides: mediators of innate immunity in the development of anti-infective, therapeutic and vaccination strategies. *Biochem Soc Trans* 2006;34:251-256.
 20. Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents* 2004;24:536-547.
 21. Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Boman HG. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 1981;292:246-248.
 22. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 1985;76:1427-35.
 23. Selsted ME, Harwig SS, Ganz T, Schilling JW, Lehrer RI. Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest* 1985; 76:1436-1439.

24. Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:5449-5453.
25. Bensch KW, Raida M, Mägert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 1995; 368(2):331-335.
26. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997;387:861.
27. Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schröder JM. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22:714-721.
28. Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, Walters JD, Jia HP, Welsh MJ, Casavant TL, McCray PB Jr. Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2002;99:2129-2133.
29. Izadpanah A, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52:381-390.
30. Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res* 2000;1:141-150.
31. Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett* 1995;374:1-5.
32. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem.* 1996;238:325-332.
33. Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett* 1995;368:173-176.

34. Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, Kogner P, Boman HG, Gudmundsson GH. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:195-199.
35. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Ståhle-Bäckdahl M, Lidén S, Wigzell H, Gudmundsson GH. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* 1997;272:15258-15263.
36. Sorensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, Borregaard N. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* 2001;97:3951-3959.
37. Murakami M, Lopez-Garcia B, Braff M, Dorschner RA, Gallo RL. Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. *J Immunol* 2004;172:3070-3077.
38. Zasloff M. Inducing endogenous antimicrobial peptides to battle infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:8913-8914.
39. Chromek M, Slamová Z, Bergman P, Kovács L, Podracká L, Ehrén I, Hökfelt T, Gudmundsson GH, Gallo RL, Agerberth B, Brauner A. The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nat Med* 2006;12:636-641.
40. Kim ST, Cha HE, Kim DY, Han GC, Chung YS, Lee YJ, Hwang YJ, Lee HM. Antimicrobial peptide LL-37 is upregulated in chronic nasal inflammatory disease. *Acta Otolaryngol* 2003;123:81-85.
41. Lau YE, Bowdish DM, Cosseau C, Hancock RE, Davidson DJ. Apoptosis of airway epithelial cells: human serum sensitive induction by the cathelicidin LL-37. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:399-409.
42. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Ståhle-Bäckdahl M, Lidén S, Wigzell H, Gudmundsson GH. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* 1997;272:15258-15263.

43. Dorschner RA, Lopez-Garcia B, Massie J, Kim C, Gallo RL. Innate immune defense of the nail unit by antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol* 2004;50:343-348.
44. Di Nardo A, Vitiello A, Gallo RL. Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J Immunol* 2003;170:2274-2278.
45. Schaubert J, Dorschner RA, Yamasaki K, Brouha B, Gallo RL. Control of the innate epithelial antimicrobial response is cell-type specific and dependent on relevant microenvironmental stimuli. *Immunology* 2006; 118:509-519.
46. Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME. Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell* 1991;64:229-230.
47. Raj PA, Dentino AR. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiol Lett* 2002;206:9-18.
48. White SH, Wimley WC, Selsted ME. Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr Opin Struct Biol* 1995 ;5:521-527.
49. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 1985;76:1427-1435.
50. Selsted ME, Harwig SS, Ganz T, Schilling JW, Lehrer RI. Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest* 1985; 76:1436-1439.
51. Ouellette AJ. Defensin-mediated innate immunity in the small intestine. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:405-419.
52. Linzmeier R, Ho CH, Hoang BV, Ganz T. A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23. *Gene* 1999;233:205-211.
53. McCray PB Jr, Bentley L. Human airway epithelia express a beta-defensin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;16:343-9.
54. Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB Jr, Ganz T. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 1998;101:1633-1642.
55. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997;387:861.

56. Ali RS, Falconer A, Ikram M, Bissett CE, Cerio R, Quinn AG. Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J Invest Dermatol* 2001;117:106-111.
57. Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BA, Greenberg EP, Valore EV, Welsh MJ, Ganz T, Tack BF, McCray PB Jr. Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:14961-14966.
58. Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 1998;102:874-880.
59. Lehmann J, Retz M, Harder J, Krams M, Kellner U, Hartmann J, Hohgräwe K, Raffenberg U, Gerber M, Loch T, Weichert-Jacobsen K, Stöckle M. Expression of human beta-defensins 1 and 2 in kidneys with chronic bacterial infection. *BMC Infect Dis* 2002;2:20.
60. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001;276:5707-5713.
61. Ghosh SK, Gerken TA, Schneider KM, Feng Z, McCormick TS, Weinberg A. Quantification of human beta-defensin-2 and -3 in body fluids: application for studies of innate immunity. *Clin Chem* 2007;53:757-765.
62. García JR, Krause A, Schulz S, Rodríguez-Jiménez FJ, Klüver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* 2001;15:1819-1821.
63. Boman HG, Agerberth B, Boman A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immun* 1993;61:2978-2984.
64. Tang YQ, Yuan J, Osapay G, Osapay K, Tran D, Miller CJ, Ouellette AJ, Selsted ME. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* 1999;286:498-502.

65. Daly NL, Chen YK, Rosengren KJ, Marx UC, Phillips ML, Waring AJ, Wang W, Lehrer RI, Craik DJ. Retrocyclin-2: structural analysis of a potent anti-HIV theta-defensin. *Biochemistry* 2007;46:9920-9928.
66. Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, Levitz SM, Diamond RD, Offner GD, Troxler RF: Histatins, a novel family of histidina-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1988;263:7472-7477.
67. vanderSpek JC, Wyandt HE, Skare JC, Milunsky A, Oppenheim FG, Troxler RF. Localization of the genes for histatins to human chromosome 4q13 and tissue distribution of the mRNAs. *Am J Hum Genet* 1989;45:381-387.
68. Gomart AF, Borregaard N, Koeffler HP. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *FASEB J* 2005;19:1067-1077.
69. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, Tavera-Mendoza L, Lin R, Hanrahan JW, Mader S, White JH. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol* 2004;173:2909-2912.
70. Schauber J, Svanholm C, Termén S, Iffland K, Menzel T, Scheppach W, Melcher R, Agerberth B, Lühns H, Gudmundsson GH. Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut* 2003;52:735-741.
71. Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Schitteck B, Garbe C, Gallo RL. Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin. *J Invest Dermatol* 2002;119:1090-1095.
72. O'neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF. Expression and regulation of the human β -defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 1999;163:6718-6724.
73. Vora P, Youdim A, Thomas LS, Fukata M, Tesfay SY, Lukasek K, Michelsen KS, Wada A, Hirayama T, Arditi M, Abreu MT. Beta-defensin-2 expression is

- regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 2004; 173:5398-5405.
74. Hertz CJ, Wu Q, Porter EM, Zhang YJ, Weismüller KH, Godowski PJ, Ganz T, Randell SH, Modlin RL. Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J Immunol* 2003;171:6820-6826.
75. Amlie-Lefond C, Paz DA, Connelly MP, Huffnagle GB, Whelan NT, Whelan HT. Innate immunity for biodefense: a strategy whose time has come. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:1334-1342.
76. Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schröder JM, Harder J. Pseudomonas aeruginosa- and IL-1beta-mediated induction of human beta-defensin-2 in keratinocytes is controlled by NF-kappaB and AP-1. *J Invest Dermatol* 2006;126:121-127.
77. Zaiou M. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J Mol Med* 2007;85:317-329.
78. Matsuzaki K, Sugishita K, Ishibe N, Ueha M, Nakata S, Miyajima K, Epand RM. Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. *Biochemistry* 1998;37:11856-11863.
79. Dagan A, Efron L, Gaidukov L, Mor A, Ginsburg H. In vitro antiplasmodium effects of dermaseptin S4 derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1059-10566.
80. Winans KA, King DS, Rao VR, Bertozzi CR. A chemically synthesized version of the insect antibacterial glycopeptide, dipteracin, disrupts bacterial membrane integrity. *Biochemistry* 1999;38:11700-11710.
81. Friedrich CL, Moyles D, Beveridge TJ, Hancock REW. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2086-2092.
82. Cudic M, Otvos L Jr. Intracellular targets of antibacterial peptides. *Curr Drug Targets* 2002;3:101-106.
83. Leikina E, Delanoe-Ayari H, Melikov K, Cho MS, Chen A, Waring AJ, Wang W, Xie Y, Loo JA, Lehrer RI, Chernomordik LV. Carbohydrate-binding molecules

- inhibit viral fusion and entry by crosslinking membrane glycoproteins. *Nat Immunol* 2005;6:995-1001.
84. Islam D, Bandholtz L, Nilsson J, Wigzell H, Christensson B, Agerberth B, Gudmundsson G. Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat Med* 2001;7:180-185.
85. Raqib R, Sarker P, Bergman P, Ara G, Lindh M, Sack DA, Nasirul Islam KM, Gudmundsson GH, Andersson J, Agerberth B. Improved outcome in shigellosis associated with butyrate induction of an endogenous peptide antibiotic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9178-9183.
86. Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9541-9546.
87. Bowdish DM, Davidson DJ, Lau YE, Lee K, Scott MG, Hancock RE. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J Leukoc Biol* 2005;77:451-459.
88. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krötz F, Zahler S, Gloe T, Issbrücker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Clauss M, Bals R. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest* 2003;111:1665-1672.
89. Bowdish DM, Davidson DJ, Lau YE, Lee K, Scott MG, Hancock RE. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J Leukoc Biol* 2005;77:451-459.
90. Schaller-Bals S, Schulze A, Bals R. Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:992-995.
91. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock RE. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J Immunol* 2002;169:3883-3891.
92. Zuyderduyn S, Ninaber DK, Hiemstra PS, Rabe KF. The antimicrobial peptide LL-37 enhances IL-8 release by human airway smooth muscle cells. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:1328-1335.

93. Bowdish DM, Davidson DJ, Speert DP, Hancock RE. The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. *J Immunol* 2004;172:3758-3765.
94. Scott MG, Gold MR, Hancock RE. Interaction of cationic peptides with lipoteichoic acid and gram-positive bacteria. *Infect Immun* 1999;67:6445-6453.
95. Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, Hirata M, Adachi Y, Tamura H, Tanaka S, Heumann D. Augmentation of the lipopolysaccharide-neutralizing activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by replacement with hydrophobic and cationic amino acid residues. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:972-982.
96. Scott MG, Vreugdenhil AC, Buurman WA, Hancock RE, Gold MR. Cutting edge: cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein. *J Immunol* 2000;164:549-553.
97. Kirikae T, Hirata M, Yamasu H, Kirikae F, Tamura H, Kayama F, Nakatsuka K, Yokochi T, Nakano M. Protective effects of a human 18-kilodalton cationic antimicrobial protein (CAP18)-derived peptide against murine endotoxemia. *Infect Immun* 1998;66:1861-1868.
98. Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, Kiessling R, Jörnvall H, Wigzell H, Gudmundsson GH. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 2000;96:3086-3093.
99. De Yang, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med* 2000;192:1069-1074.
100. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krötz F, Zahler S, Gloe T, Issbrücker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Clauss M,

- Bals R. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest* 2003;111:1665-1672.
101. Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur J Immunol* 2001;31:1066-1075.
102. Davidson DJ, Currie AJ, Reid GS, Bowdish DM, MacDonald KL, Ma RC, Hancock RE, Speert DP. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J Immunol* 2004;172:1146-1156.
103. McGwire BS, Olson CL, Tack BF, Engman DM. Killing of African trypanosomes by antimicrobial peptides. *J Infect Dis* 2003;188:146-152.
104. Guthmiller JM, Vargas KG, Srikantha R, Schomberg LL, Weistroffer PL, McCray PB Jr, Tack BF. Susceptibilities of oral bacteria and yeast to mammalian cathelicidins. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3216-3219.
105. Borenstein LA, Ganz T, Sell S, Lehrer RI, Miller JN. Contribution of rabbit leukocyte defensins to the host response in experimental syphilis. *Infect Immun* 1991;59:1368-1377.
106. Howell MD, Jones JF, Kisich KO, Streib JE, Gallo RL, Leung DY. Selective killing of vaccinia virus by LL-37: implications for eczema vaccinatum. *J Immunol* 2004;172:1763-1767.
107. Steinstraesser L, Tippler B, Mertens J, Lamme E, Homann HH, Lehnhardt M, Wildner O, Steinau HU, Uberla K. Inhibition of early steps in the lentiviral replication cycle by cathelicidin host defense peptides. *Retrovirology* 2005;2:2.
108. Rivas-Santiago B, Schwander SK, Sarabia C, Diamond G, Klein-Patel ME, Hernandez-Pando R, Ellner JJ, Sada E. Human {beta}-defensin 2 is expressed and associated with *Mycobacterium tuberculosis* during infection of human alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 2005;73:4505-4511.

109. Méndez-Samperio P, Alba L, Trejo A. Mycobacterium bovis-mediated induction of human beta-defensin-2 in epithelial cells is controlled by intracellular calcium and p38MAPK. *J Infect* 2007;54:469-474.
110. Bastian A, Schäfer H. Human alpha-defensin 1 (HNP-1) inhibits adenoviral infection in vitro. *Regul Pept* 2001;101:157-161.
111. Chaly YV, Paleolog EM, Kolesnikova TS, Tikhonov II, Petratchenko EV, Voitenok NN. Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Eur Cytokine Netw* 2000;11:257-266.
112. Murphy CJ, Foster BA, Mannis MJ, Selsted ME, Reid TW. Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* 1993;155:408-413.
113. Aarbiou J, Verhoosel RM, Van Wetering S, De Boer WI, Van Krieken JH, Litvinov SV, Rabe KF, Hiemstra PS. Neutrophil defensins enhance lung epithelial wound closure and mucin gene expression in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30:193-201.
114. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 2005;17:359-365.
115. Zhang K, Lu Q, Zhang Q, Hu X. Regulation of activities of NK cells and CD4 expression in T cells by human HNP-1, -2, and -3. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323:437-444.
116. Buck CB, Day PM, Thompson CD, Lubkowski J, Lu W, Lowy DR, Schiller JT. Human alpha-defensins block papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:1516-1521.
117. Chen X, Niyonsaba F, Ushio H, Okuda D, Nagaoka I, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Dermatol Sci* 2005;40:123-132.
118. 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* 2006;194:697-701.

119. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999;286:525-528.
120. Niyonsaba F, Iwabuchi K, Matsuda H, Ogawa H, Nagaoka I. Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *Int Immunol* 2002;14:421-426.
121. Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, Shirakawa AK, Farber JM, Segal DM, Oppenheim JJ, Kwak LW. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* 2002;298:1025-1029.
122. Howell MD. The role of human beta defensins and cathelicidins in atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7:413-417.
123. Feng Z, Dubyak GR, Lederman MM, Weinberg A. Cutting edge: human beta defensin 3--a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4. *J Immunol* 2006;177:782-786.
124. Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC. Human defensins. *J Mol Med* 2005;83:587-595.
125. Cole AM, Hong T, Boo LM, Nguyen T, Zhao C, Bristol G, Zack JA, Waring AJ, Yang OO, Lehrer RI. Retrocyclin: a primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:1813-1818.
126. Wang W, Mulakala C, Ward SC, Jung G, Luong H, Pham D, Waring AJ, Kaznessis Y, Lu W, Bradley KA, Lehrer RI. Retrocyclins kill bacilli and germinating spores of *Bacillus anthracis* and inactivate anthrax lethal toxin. *J Biol Chem* 2006;281:32755-32764.
127. Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, Levitz SM, Diamond RD, Offner GD, Troxler RF. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1988;263:7472-7477.

128. Xu T, Levitz SM, Diamond RD, Oppenheim FG. Anticandidal activity of major human salivary histatins. *Infect Immun* 1991;59:2549-2554.
129. Mason CM, Nelson S. Pulmonary host defenses and factors predisposing to lung infection. *Clin Chest Med* 2005;26:11-17.
130. Hiemstra PS. Defensins and cathelicidins in inflammatory lung disease: beyond antimicrobial activity. *Biochem Soc Trans.* 2006;34:276-278.
131. Tosi MF. Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:241-249.
132. Nizet V. Understanding how leading bacterial pathogens subvert innate immunity to reveal novel therapeutic targets. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:13-22.
133. Rozy A, Chorostowska-Wynimko J. Bacterial immunostimulants--mechanism of action and clinical application in respiratory diseases. *Pneumonol Alergol Pol.* 2008;76(5):353-9.
134. Orcel B, Delclaux B, Baud M, Derenne JP. Oral immunization with bacterial extracts for protection against acute bronchitis in elderly institutionalized patients with chronic bronchitis. *Eur Respir J* 1994;7:446-52.
135. Lusuardi M. Challenging mucosal immunity with bacterial extracts to prevent respiratory infections: an old therapy revisited. *Monaldi Arch Chest Dis* 2004;61:4-5.
136. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 2008;87:1080S-6S.
137. Mosekilde L. Vitamin D requirement and setting recommendation levels: long-term perspectives. *Nutr Rev* 2008 Oct;66:S170-7.
138. Grünberg K, Timmers MC, Smits HH, de Klerk EP, Dick EC, Spaan WJ, Hiemstra PS, Sterk PJ. Effect of experimental rhinovirus 16 colds on airway hyperresponsiveness to histamine and interleukin-8 in nasal lavage in asthmatic subjects in vivo. *Clin Exp Allergy* 1997;27:36-45
139. Belda J, Parameswaran K, Keith PK, Hargreave FE. Repeatability and validity of cell and fluid-phase measurements in nasal fluid: a comparison of two methods of nasal lavage. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1111-5

140. Rivas-Santiago B, Hernandez-Pando R, Carranza C, Juarez E, Contreras JL, Aguilar-Leon D, Torres M, Sada E. Expression of cathelicidin LL-37 during *Mycobacterium tuberculosis* infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. *Infect Immun* 2008;76:935-41.
141. Sørensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, Liu L, Roberts AA, Ganz T. Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J Immunol* 200;174:4870-9.
142. Allergic airway inflammation inhibits pulmonary antibacterial host defense. Beisswenger C, Kandler K, Hess C, Garn H, Felgentreff K, Wegmann M, Renz H, Vogelmeier C, Bals R. *J Immunol* 2006;177:1833-7.
143. Schaubert J, Dorschner RA, Coda AB, Büchau AS, Liu PT, Kiken D, Helfrich YR, Kang S, Elalieh HZ, Steinmeyer A, Zügel U, Bikle DD, Modlin RL, Gallo RL. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2007;117:803-11.
144. Chen PH, Fang SY. Expression of human beta-defensin 2 in human nasal mucosa. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2004;261:238-241.
145. Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán-Juárez LM. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol* 2010;135:1-11.
146. Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, Weber G, Sørensen O, Borregaard N, Ståhle-Bäckdahl M. The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J Invest Dermatol* 2003;120:379-89.
147. Baroni A, Donnarumma G, Paoletti I, Longanesi-Cattani I, Bifulco K, Tufano MA, Carriero MV. Antimicrobial human beta-defensin-2 stimulates migration, proliferation and tube formation of human umbilical vein endothelial cells. *Peptides* 2009;30:267-72.
- 148.

XVI. ANEXOS

ANEXO 1

Técnica de cultivo de células A-549

1. Se descongela en baño maria a 37°C
2. Se transfiere el contenido del vial a un tubo de centrifuga de 14 ml, el cual contiene 9 ml de medio F12K con suero fetal bovino (SFB) al 15%.
3. Se centrifuga a 3500 RPM durante 10 min a 4 C.
4. Se descarta el sobrenadante y la pastilla de células se resuspende en un volumen “adecuado” del medio F12K con SFB al 15%, para posteriormente incubarse a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%.
5. Cuando se observe confluencia del 90 al 100% se procede a inocular el agente deseado o bien a propagar las células.
6. Para lograr la propagación de las células, estas deben presentar una confluencia del 90 al 100% en el frasco de cultivo. Se lavan las células 2 veces con 3 ml de PBS (Phosphated buffer saline) y posteriormente se añaden 3 ml de Tripsina-EDTA al 0.25%, se incuban de 5 a 10 min a 37°C y atmósfera al 5% de CO₂.
7. Una vez despegadas las células, se transfieren los 3 ml a un tubo de centrifuga de 14 ml con 9 ml de medio F12K, y se centrifuga a 3500 RPM, 37°C.
8. Se descarta el sobrenadante y la pastilla se resuspende en un tubo con un volumen “adecuado” de medio F12K y SFB al 15%.
9. Se transfiere a los frascos que se quieren cultivar y se incuban a 37°C, 5% CO₂.
10. Para inocular el agente deseado, el frasco debe estar en un 90 a 100% de confluencia, posteriormente se lava el frasco 2 veces con 3 ml de PBS.
11. Se inocular el agente deseado a la concentración necesaria, y se incuba el tiempo establecido en el protocolo.

ANEXO 2

La fórmula de bacterias inactivadas utilizadas en el presente estudio, está elaborada por API ASAC Pharmaceutical Immunology, S. A., fundada en 1986, en España, y se rige por los más altos estándares de calidad de la comunidad Europea. Dicha empresa tiene una filial en México, Ipi ASAC México, S.A. de C.V., que se encarga de comercializar y distribuir los productos elaborados por esta. La fórmula liofilizada Sublingual III, tiene en el mercado Mexicano 10 años, y ha sido utilizada para el tratamiento de miles de pacientes, sin reportes adversos.

Bacteriana Sublingual

Suspensión de antígenos bacterianos, prescritos por el especialista, en función del diagnóstico establecido sobre el paciente.



[Ampliar](#)

TRATAMIENTO BACTERIANO

NASOFARINGEO-SUBLINGUAL
COMPOSICIÓN POR VIAL

Composición por vial una vez reconstituido:

Antígeno bacteriano... 2600 millones/ml
Clorhexidina..... 0,01%
Tween..... 0,15%
Agua calidad inyectable
c.s.p. 8 ml.

Fórmula liofilizada Sublingual III, Frasco 2. (*S. Pneumoniae*, *Brahmanela catarrhalis*, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus alfa-hemolítico*, *Streptococcus beta-hemolítico*, *Streptococcus fecales*, *S. epidermidis*, *Bordetella pertussis*, *proteus sp*, *pseudomonas sp*, *E. coli*, *corynebacterium diphteriae*).

INDICACIONES

Catarros de repetición, bronquitis obstructiva crónica y asma por infección bacteriana.

CONTRAINDICACIONES

Durante las fases agudas de la enfermedad debe suspenderse el tratamiento, reiniciándolo cuando los síntomas hayan desaparecido.

PRECAUCIONES

Adminístrese el preparado tal como se indica en este prospecto, en el apartado de instrucciones para la correcta administración.

INTERACCIONES

No se han descrito.

ANEXO 3-A

Human BD-2 ELISA Development Kit 900-K172 Lot# 0807172

Description: Human BD-2 ELISA development kit contains the key components required for the quantitative measurement of natural and/or recombinant hBD-2 in a sandwich ELISA format within the range of 8-1000pg/ml. Using the ELISA protocol described below, the recommended microplates, reagents and solutions, the components supplied in this kit are sufficient to assay hBD-2 in approximately 1000 ELISA plate wells.

RECONSTITUTION & STORAGE

Capture Antibody: 25µg of antigen-affinity purified goat anti-hBD-2 + 2.5mg D-mannitol. Centrifuge vial prior to opening. Reconstitute in 0.25ml sterile water for a concentration of 100µg/ml.

Detection Antibody: 50µg of biotinylated antigen-affinity purified goat anti-hBD-2 + 2.5mg D-mannitol. Centrifuge vial prior to opening. Reconstitute in 0.5ml sterile water for a concentration of 100µg/ml.

Human BD-2 Standard: 1µg of recombinant hBD-2 + 2.2mg BSA + 11.0mg D-mannitol. Centrifuge vial prior to opening. Reconstitute in 1ml sterile water for a concentration of 1µg/ml.

Note: The reconstituted components are stable for 2 weeks when stored at 2-8°C. Components that have been reconstituted and aliquoted can be stored at -20°C for up to 6 months.

Avidin-HRP Conjugate: 60µl vial. Upon receipt, avidin-HRP conjugate should be aliquoted into ten 6µl vials and stored at ≤-20°C. Aliquots stored frozen at ≤-20°C are stable for up to 2 years from date of receipt. Avoid more than one freeze-thaw cycle. Avidin should be used in conjunction with ABTS only.

RECOMMENDED MATERIALS

ELISA microplates (Nunc MaxiSorp Prod. # 439454);
Tween-20 (Sigma Cat. # P-7949);
BSA (Sigma Cat # A-7030);
ABTS Liquid Substrate Solution (Sigma Cat. # A3219);
Dulbecco's PBS [10x] (Gibco BRL Cat. # 14200-075).

RECOMMENDED SOLUTIONS

All solutions should be at ambient temperature prior to use.

PBS: dilute 10xPBS to 1xPBS, pH 7.20 in sterile water.

Wash Buffer: 0.05% Tween-20 in PBS

Block Buffer: 1% BSA in PBS *

Diluent: 0.05% Tween-20, 0.1% BSA in PBS *

* Sterile filter and store at 4°C for up to 1 week

PLATE PREPARATION

1. Dilute capture antibody with PBS to a concentration of 0.25µg/ml. Immediately, add 100µl to each ELISA plate well. Seal the plate and incubate overnight at room temperature.
2. Aspirate the wells to remove liquid and wash the plate 4 times using 300µl of wash buffer per well.

After the last wash invert plate to remove residual buffer and blot on paper towel.

3. Add 300µl block buffer to each well. Incubate for at least 1 hour at room temperature.
4. Aspirate and wash plate 4 times.

ELISA PROTOCOL

Standard/Sample: dilute standard from 1ng/ml to zero in diluent. Immediately add 100µl of standard or sample to each well in triplicate. Incubate at room temperature for at least 2 hours.

Detection: Aspirate and wash plate 4 times.

Dilute detection antibody in diluent to a concentration of 0.5µg/ml. Add 100µl per well. Incubate at room temperature for 2 hours.

Avidin-HRP Conjugate: Aspirate and wash plate 4 times. Dilute 5.5µl of avidin-HRP conjugate 1:2000 in diluent for a total volume of 11ml. Add 100µl per well. Incubate 30 minutes at room temperature.

ABTS Liquid Substrate:

(ABTS Substrate should be at ambient temperature prior to use)

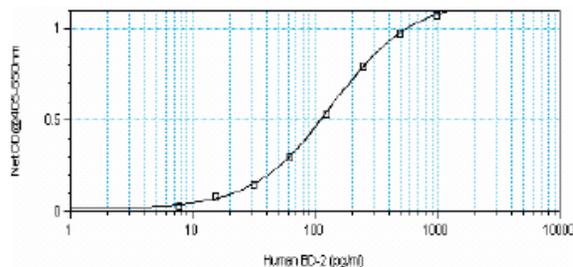
Aspirate and wash plate 4 times. Add 100µl of substrate solution to each well. Incubate at room temperature for color development. Monitor color development with an ELISA plate reader at 405 nm with wavelength correction set at 650 nm.

NOTE: Reliable standard curves are obtained when either O.D. readings do not exceed 0.2 units for the zero standard concentrations, or 1.5 units for the highest standard concentration. The plate should be monitored at 5-minute intervals for approximately 35 minutes. *O.D. readings may vary.*

CROSS REACTIVITY

When tested at 50ng/ml the following antigens did not exhibit significant cross reactivity:

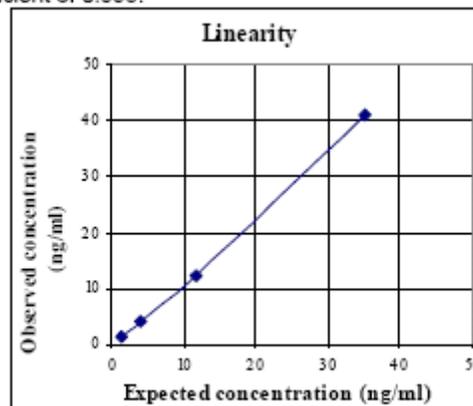
Human BD-1 (36a.a.), BD-1 (47a.a.), BD-3



ANEXO 3-B

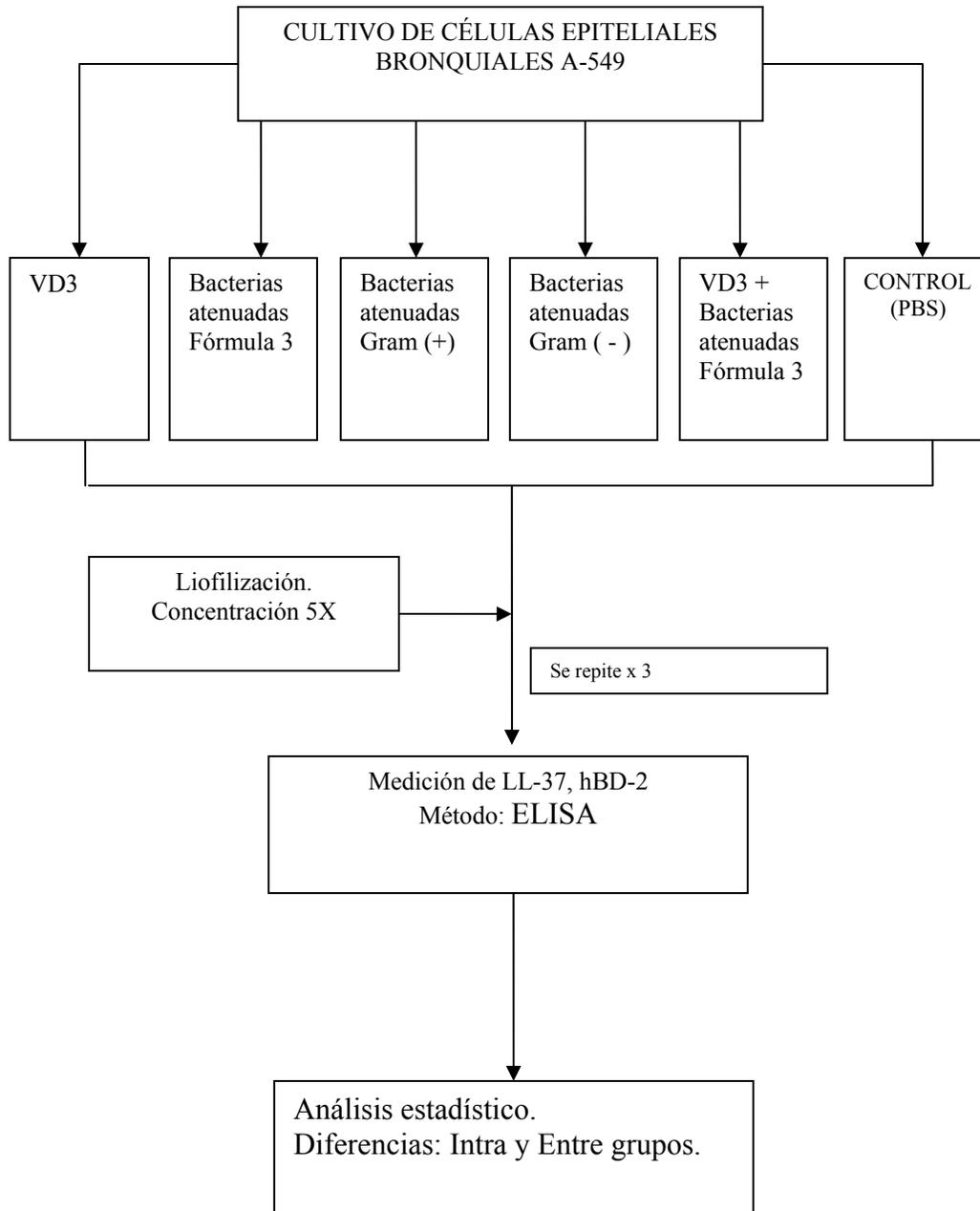
HUMAN LL-37 ELISA Kit

Application	<p>The human LL-37 ELISA has been developed for the quantitative measurement of natural and recombinant LL-37 in plasma and cell culture medium. In plasma samples, human LL-37 can be measured accurately if plasma samples are diluted at least 20 times. Most reliable results are obtained if EDTA plasma is used.</p> <p>Please be aware that human LL-37 is released from neutrophils into serum in the process of blood coagulation. This will lead to false positive and difficult to interpret results of serum samples. Therefore it is advised to use 'careful plasma'.</p>
Features	<ul style="list-style-type: none">▪ Minimum concentration which can be measured is 0.14 ng/ml human LL-37.▪ Measurable concentration range of 0.14-100 ng/ml.▪ Working volume of 100 µl/well.
Principle	<ul style="list-style-type: none">▪ The human LL-37 ELISA is a ready-to-use solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay based on the sandwich principle with a working time of 3½ hours.▪ The efficient format of 2 plates with twelve disposable 8-well strips allows free choice of batch size for the assay.▪ Samples and standards are captured by a solid bound specific antibody.▪ Biotinylated tracer antibody will bind to captured human LL-37.▪ Streptavidin-peroxidase conjugate will bind to the biotinylated tracer antibody.▪ Streptavidin-peroxidase conjugate will react with the substrate, tetramethylbenzidine (TMB).▪ The enzyme reaction is stopped by the addition of citric acid.▪ The absorbance at 450 nm is measured with a spectrophotometer. A standard curve is obtained by plotting the absorbance (linear) versus the corresponding concentrations of the human LL-37 standards (log).▪ The human LL-37 concentration of samples, which are run concurrently with the standards, can be determined from the standard curve.
Storage and stability	<p>Product should be stored at 4°C. Under recommended storage conditions, product is stable for at least six months. After reconstitution the reagents are stable for 1 month if stored at 2-8°C, except for the standard.</p> <p>After reconstitution the standard is stable for 12 hours. For longer stability we recommend to store aliquots at -20°C.</p>
Recovery	<p>Normal human blood samples (plasma), were spiked with human LL-37 in concentrations of 35 and 0.7 ng/ml. Samples with and without human LL-37 were incubated for 1 hour at room temperature. Samples were measured using the ELISA. Values for human LL-37 ranged between 79% and 100% (mean 90%).</p>
Linearity	<p>The linearity of the assay was determined by serially diluting a sample containing 35 ng/ml human LL-37. The diluted samples were measured in the assay. The line obtained a slope of 1.185 and a correlation coefficient of 0.999.</p>



ANEXO 4

DIAGRAMA DEL ESTUDIO



ANEXO 6

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Lugar y Fecha _____

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado: “**Inducción de péptidos antimicrobianos en mucosa nasal**”

Registrado ante el Comité Local de Investigación en Salud:

El objetivo del estudio es: Determinar los niveles de péptidos antimicrobianos en lavados nasales, tras la exposición a diferentes concentraciones de Vitamina D y Bacterias atenuadas.

Se aplicará por medio de un spray nasal distintas concentraciones de Vitamin D, Bacterias atenuadas, o una combinación de ambas. Posteriormente se realizará un lavado nasal después de la aplicación a cada estímulo. El líquido obtenido del lavado nasal será procesado en el laboratorio, donde se determinarán los niveles de péptidos antimicrobianos. Como parte del protocolo se le realizarán pruebas cutáneas, para verificar si padece alergia.

Riesgos: la vitamina D y las bacterias inactivadas se han utilizado para otras enfermedades, sin haberse reportado riesgos importantes. En el caso de la vitamina D, la dosis nasal no excederá lo dosis diaria máxima recomendada (200 a 400 UI). Dado que la aplicación será nasal, puede existir la posibilidad de presentar irritación y sensación de obstrucción nasal. No existe compensación económica en caso de complicaciones por el procedimiento, sin embargo, El Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias se hará cargo de la atención médica, siempre que la complicación se haya derivado del protocolo.

Beneficios: usted estará participando en un proyecto de investigación de alto impacto, que podría derivar en la prevención de enfermedades infecciosas que afectan al aparato respiratorio, incluida la gripa, sinusitis, y neumonía.

El presente estudio no generará algún costo extra por participación o procesamiento de muestras. El número total de paciente a incluir en el estudio es de 20.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio. Entiendo que al aceptar el presente consentimiento informado estoy autorizando el acceso a mi expediente médico a terceros.

El investigador principal se ha comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevaran a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento (en caso de que el proyecto modifique o interfiera con el tratamiento habitual del paciente el investigador se compromete a dar información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento)

ANEXO 6

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el instituto.

El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que se deriven de este estudio u de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

En caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio, comunicarse al teléfono 54871740 Pabellón 11 (Investigación en inmunogenética y alergia), con el Dr. Eduardo Guaní Guerra o el Dr. Luis Manuel Terán Juárez.

Nombre y firma del paciente / Fecha

Nombre y Firma Testigo 1 / Fecha.

Domicilio del Testigo 1

Nombre y Firma Testigo 2 / Fecha.

Domicilio del Testigo 2

Nombre y firma del Investigador / Fecha

ANEXO 7

TÉCNICA MODIFICADA DE GREIFF Y GRUÈNBERG:

1. El lavado nasal se realizará utilizando una sonda Foley de 14 G, de silicón. La punta de la sonda se corta en la porción distal, manteniendo el balón intacto.
2. La punta de la sonda se introduce 1.5cm, teniendo cuidado de no lesionar el septum nasal.
3. Con el sujeto sentado, en posición de escritura, se infla el globo, y posteriormente se instilan 5ml de solución salina, por medio de una jeringa colocada en el extremo de la sonda Foley. Se pide al paciente que trate de ocluir el espacio nasofaríngeo al elevar la porción posterior de la lengua y el paladar blando, evitando así que la solución instilada sea deglutida, y se deja la solución instilada 2 minutos en cavidad nasal. Posteriormente se extrae la mezcla de solución salina y moco con la misma jeringa.
4. Se instilan otros 5 ml de solución salina al 0.9%, y se repite el procedimiento previamente descrito. Se procede a desinflar el globo de la sonda Foley, y ulteriormente se retira la misma.
5. La muestra se guarda en tubos estériles de plástico (Falcon), y es enviada para su procesamiento.^{138,139}

Clin Exp Allergy 2001;31:1111-5.

ANEXO 8

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA:

1. El líquido obtenido por lavado nasal es centrifugado a 1500 revoluciones durante 10 minutos.
2. El sobrenadante es colocado en otro recipiente, y al remanente del centrifugado ese le aplica dithiothreitol (Sputolysin, Calbiochem Corp., San Diego, CA, USA), con el fin de degradar el moco. Una vez degradado el moco, se realiza un conteo de células en la cámara de Neubauer, posteriormente se verifica viabilidad celular por medio de una tinción de Azul de Tripano.
3. Posteriormente se colocan 10 μ l del remanente en el citospin, y se centrifuga a 7g por 6 minutos (Shandon III cytocentrifuge), el volumen impactado se tiñe con Tinción de Wright modificada para realizar, posteriormente, conteo celular por microscopio.
4. El sobrenadante del lavado nasal, obtenido de la primera centrifugación (pasos 1 y 2), se somete a liofilización y posteriormente se reconstituye con solución salina 0.9%, para concentrar así 10 veces el volumen inicial.
5. El volumen reconstituido, y concentrado 10 veces, se guarda a -70°C en congelador REVCO, hasta que vaya ser utilizado para cuantificación de hBD-2 y LL-37 por el método de ELISA.

ANEXO 9

No.Folio:

**FORMATO CAPTACIÓN DE DATOS:
INDUCCIÓN DE PÉPTIDOS**Nombre: _____
e-mail: _____Edad: _____ Fecha de Nacimiento: _____ Sexo: Masculino
dd / mm / aa Femenino

Lugar de Origen: _____ Lugar actual de Residencia: _____

Antecedente Tabaquismo: Si No Tabaquismo Actual: Si No Antecedente de cirugías nasales: Si No Antecedentes de fractura nasal: Si No Antecedentes rinitis alérgica: Si No

En caso de tener rinitis marque con una cruz aquella condición que se asocie con su cuadro:

- Incrementa por el frío o calor
- Incrementa por la noche
- Incrementa con olores fuertes
- Incrementa tras la exposición a alergeno conocido (gato, polvo, polen etc)

Antecedentes de asma: Si No ¿Ha recibido tratamiento con inmunotepia o vacunas para alergia? Si No Antecedentes de rinosinusitis: Si No No. de rinosinusitis por año: _____

Número de cuadros gripales o rinofaringitis por año (últimos 5 años): _____

Otras enfermedades: _____

Medicamentos de uso actual o uso frecuente: _____

Marque con una cruz el cuadrado, si corresponde con algún síntoma o signo que usted presente:

Rinorrea Obstrucción nasal Prurito nasal Estornudos en salva Voz nasal
Cacosmia Mal aliento Ojo rojo Lagrimeo Prurito ocular Tos Falta de
aire Opresión torácica Sibilancias Resultado de Pruebas cutáneas: Positivo Negativo

Alergeno(s) causante de sensibilización: _____

¿Durante la administración del spray nasal presentó alguna sintomatología? Si No

Si la respuesta es afirmativa por favor especifique o describa la sintomatología:

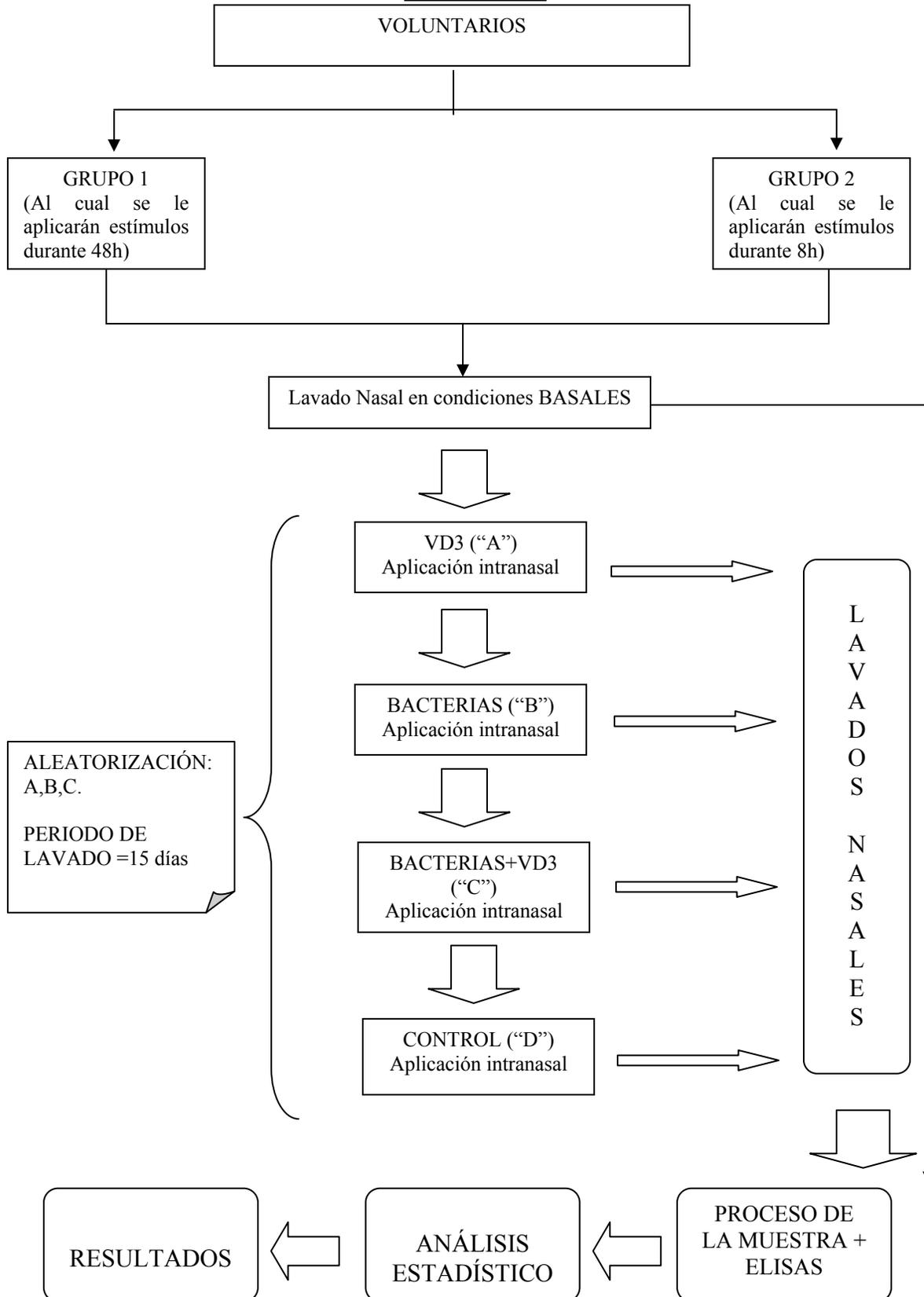
-Spray 1 ("D"): _____

-Spray 2 ("A"): _____

-Spray 3 ("B"): _____

-Spray 4 ("C"): _____

ANEXO 10



ANEXO 11

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Lugar y Fecha _____

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado: **“Inducción de péptidos antimicrobianos en mucosa nasal”**

Registrado ante el Comité Local de Investigación en Salud:

El objetivo del estudio es: Determinar los niveles de péptidos antimicrobianos en lavados nasales, tras la exposición a diferentes concentraciones de Vitamina D y Bacterias atenuadas.

Se aplicará por medio de un spray nasal distintas concentraciones de Vitamin D, Bacterias atenuadas, o una combinación de ambas. Posteriormente se realizará un lavado nasal después de la aplicación a cada estímulo. El líquido obtenido del lavado nasal será procesado en el laboratorio, donde se determinarán los niveles de péptidos antimicrobianos. Como parte del protocolo se le realizarán pruebas cutáneas, para verificar si padece alergia.

Riesgos: la vitamina D y las bacterias inactivadas se han utilizado para otras enfermedades, sin haberse reportado riesgos importantes. En el caso de la vitamina D, la dosis nasal no excederá lo dosis diaria máxima recomendada (200 a 400 UI). Dado que la aplicación será nasal, puede existir la posibilidad de presentar irritación y sensación de obstrucción nasal. No existe compensación económica en caso de complicaciones por el procedimiento, sin embargo, El Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias se hará cargo de la atención médica, siempre que la complicación se haya derivado del protocolo.

Beneficios: usted estará participando en un proyecto de investigación de alto impacto, que podría derivar en la prevención de enfermedades infecciosas que afectan al aparato respiratorio, incluida la gripa, sinusitis, y neumonía.

El presente estudio no generará algún costo extra por participación o procesamiento de muestras. El número total de paciente a incluir en el estudio es de 20.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio. Entiendo que al aceptar el presente consentimiento informado estoy autorizando el acceso a mi expediente médico a terceros.

El investigador principal se ha comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevaran a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento (en caso de que el proyecto modifique o interfiera con el tratamiento habitual del paciente el investigador se compromete a dar información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento)

ANEXO 11

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el instituto.

El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que se deriven de este estudio u de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

En caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio, comunicarse al teléfono 54871740 Pabellón 11 (Investigación en inmunogenética y alergia), con el Dr. Eduardo Guaní Guerra o el Dr. Luis Manuel Terán Juárez.

Nombre y firma del paciente / Fecha

Nombre y Firma Testigo 1 / Fecha.

Domicilio del Testigo 1

Nombre y Firma Testigo 2 / Fecha.

Domicilio del Testigo 2

Nombre y firma del Investigador / Fecha

ANEXO 12

Técnica de Inmunohistoquímicas. Tejidos en Parafina.

1. Desparafinar. Preparar el horno de 60-65° C. El tiempo de desparafinar va desde 20min hasta 1hr dependiendo de la cantidad de laminillas y de la calidad de la parafina.(algunas laminillas se desparafinan mas rápidamente).
 2. Tren de Hidratación/deshidratación.
 - Hidratación
 - a) Xilol_{abs}(100%)
 - b) Xilol_{abs}(100%)
 - c) Xilol_{abs}/Etanol(50:50)
 - d) Etanol(100%)
 - e) Etanol(100%)
 - f) Etanol(90%)
 - g) Etanol(70%)
 - h) H₂O Destilada.
 3. Recuperación antigénica. En un Vaso Coplin(VC) se pone a calentar Citrato de sodio (0.01M pH=6.0)en Baño María a 90° C con agitación durante 20min.(Poner a precalentar el citrato cuando se este en el tren de Etanol al 70%)
 4. Realizar 3 lavados PBS 1x en VC en agitación, c/u de 5min.
 5. Eliminar Peroxidasa Endógena. Presencia de Eritrocitos. Se llevan a cabo con Metanol_{abs}/H₂O₂ al 30% .Se llevan a cabo 2 lavados de 15min c/u.
Metanol_{abs}/H₂O₂ al 30%
27ml / 3ml
 6. Se realiza un lavado con H₂O destilada 5min y agitación.
 7. Se realiza un lavado con PBS 5min y agitación.
 8. Bloqueo con albúmina bovina al 1% SBA (0.1 g de SBA en 10 ml de PBS) *
Se secan las laminillas con una gasa, cuidando de no llevarse ni maltratar el tejido, se delimita el tejido con el plumón hidrofóbico y se bloquea con el SNC al 2%.Y poner en cámara húmeda de 1hr-6hrs en agitación. Entre más tiempo de bloqueo mejor, ya que hay menos unión inespecífica.
- 8.1) Si hay Fondo en la laminilla.Bloqueo Avidina/Biotina. *
- Se utiliza el kit de Avidina/biotina.
- AVIDINA. Agregar 1 gota de avidina, incubar por 15min en cámara húmeda. Después lavar 1 vez con PBS 1x
 - BIOTINA. Agregar 1 gota de Biotina, incubar por 15min en cámara húmeda. Después lavar 1 vez con PBS 1x

Continuar con el anticuerpo Primario.

9. Anticuerpo Primario(Ab 1°).sin Lavar poner el Primer anticuerpo entre 50-70ul, dependiendo del tamaño del tejido.
10. Dejar incubar en cámara húmeda con agitación TODA LA NOCHE.
11. 11. Realizar 5 lavados de 8min c/u con agitación en el VC con PBS 1x.
12. 12. * Anticuerpo Secundario(Ab 2°).este puedes ser con el Kit universal biotilnado(KU) o un anticuerpo biotilnado(específico) a una concentración de 1:500 para todas las muestras y los controles de isotipo. Incubar en cámara húmeda con agitación durante 30min.
 - Kit universal biotilnado= 1 gota del link(α -cabra, α -conejo, α -ratón)
 - Anticuerpo Específico= 50-70ul del Ab.
13. Realizar 3 lavados con PBS 1x con agitación durante 5min.
14. Revelar diaminobecidina(DAB)...súper cancerígeno, el cual se inactiva con cloro. Se observa al microscopio desde 30seg hasta 15min...con cronómetro en mano para tomar el tiempo de revelado. Siempre se empieza de la mayor concentración a la menor.
Para en H₂O de la llave. Realizar 2 lavados con agua de la llave.
15. Contrateñir con Hematoxilina 30 seg. Esto depende de la concentración de la hematoxilina. Puede ir desde 3-30seg.
16. Tren de Hidratación/deshidratación.
 - Deshidratación

a) Etanol(90%)	}	5 min Cada
b) Etanol(100%)		
c) Xilol _{abs} /Etanol(50:50)		
d) Xilol _{abs} (100%)		
17. Montar las laminillas con resina y cubreobjetos. Los cubreobjetos deben de estar limpios.
18. Dejar secar toda la noche para evitar q se mueva el cubreobjetos Para una revisión rápida en el microscopio, poner a secar de 5-10min en le horno.
19. Observar al microscopio.

ANEXO 13

**FORMATO DE CAPTACIÓN DE DATOS:
"Inducción de péptidos antimicrobianos en epitelio respiratorio"
BIOPSIA MUCOSA NASAL**

Nombre: _____	_____
No. Expediente _____	Teléfono: _____
Edad: _____	Fecha de Nacimiento: _____ dd / mm / aa
	Sexo: Masculino <input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/>
Fecha toma de la biopsia: _____ dd / mm / aa	
Cirujano que realizó biopsia: _____	
Motivo de la cirugía: _____	
Cirugía programada: _____	
Cirugía realizada: _____	
Número de biopsias enviadas: _____	
Persona que entrega la biopsia: _____ Nombre y Firma	
Persona que recibe la biopsia: _____ Nombre y Firma	
Relización previa de pruebas cutáneas (PC): Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	
Resultado de PC: Positivas <input type="checkbox"/> Negativas <input type="checkbox"/>	
Alrgeno (s) causante de sensibilización: _____	
<p>Recordar que:</p> <ul style="list-style-type: none"> -El paciente debe firmar hoja de consentimiento informado. -El paciente debe ser sometido a pruebas cutáneas preferentemente antes del procedimiento quirúrgico, en su defecto podrán realizarse después. Las pruebas cutáneas se realizarán en el pabellón 11. La solicitud de pruebas cutáneas debe estar marcada como "protocolo PAM". -Si el paciente ya cuenta con resultado de pruebas cutáneas favor de anotarlos en el presente modelo de captación. -El paciente debe estar libre de procesos infecciosos al momento de realizar biopsia. -La biopsia deberá transportarse en el medio de cultivo específico al pabellón 11, en un lapso no mayor a 3h. 	

ANEXO 13

Recordar que:

- El paciente debe estar libre de esteroides sistémicos o locales (nasales) al menos 7 días previos al evento quirúrgico.
- El paciente debe estar libre de enfermedades sistémicas, en especial que afecten la vía aérea superior, tales como granulomatosis de Wegener, Poliposis nasosinusal, Sx. de Samter, etc.

Resumen clínico:

Antecedente Tabaq: Si No Tabaquismo Actual: Si No

-Antecedentes de importancia: DM , HAS , Sinusitis , Cirugías nasales previas ,
Rinitis , Asma Otros : _____

-Medicamentos de uso actual: _____

Observaciones:

XVII. GLOSARIO

- **Bacterias inactivadas:** bacterias sometidas a un proceso de inactivación (calor), que inhibe todo proceso metabólico y por ende su potencial actividad patogénica.
- **Barrel stave model:** modelo propuesto para explicar uno de los mecanismos por medio del cual los péptidos antimicrobianos ejercen sus propiedades antibacterianas, en el cual se postula que los PAM dada su carga positiva, son atraídos hacia las membranas celulares de las bacterias, causando un incremento en la permeabilidad de la membrana, que se traduce en lisis y muerte celular
- **Carpet model:** modelo propuesto para explicar uno de los mecanismos por medio del cual los péptidos antimicrobianos ejercen sus propiedades antibacterianas, el cual fue propuesto inicialmente para describir el mecanismo de acción de la dermaseptina. Aquí los péptidos “alfombran” o cubren la superficie de la membrana bacteriana, alineando sus residuos hidrofílicos con la cabeza de los fosfolípidos localizados en la bicapa bacteriana. Posteriormente los péptidos se reorientan hacia sus centros hidrofóbicos, formando una esfera que desintegra o causa disrupción en la membrana bacteriana.
- **Catelicidina (LL-37):** Péptido antimicrobiano que en el humano proviene de una preproteína conocida por sus siglas en inglés como hCAP-18, “human cationic antimicrobial peptide-18”. La catelicidina es llamada también LL-37 pues su estructura comienza con dos residuos de leucina y se compone de 37 aminoácidos. Este péptido es producido principalmente por células mieloides, neutrófilos, mastocitos y monocitos. Sin embargo, otra fuente importante de este péptido la constituyen las células epiteliales incluidas células epiteliales del tracto urinario, células del epitelio respiratorio (incluyendo nariz y pulmón), queratinocitos y enterocitos.
- **Células A-549:** células epiteliales basales alveolares de adenocarcinoma humano. Esta línea fue aislada en 1972, y desde esa fecha ha sido utilizada en múltiples estudios in vitro, dadas sus características fisiológicas.
- **Colecalciferol (VD3):** es la forma activa de la vitamina D. Puede obtenerse de la dieta o por la acción de los rayos ultra violeta tipo B (UVB) sobre el 7-dehidrocolesterol en la piel. Inicialmente se identificó su rol sobre la homeostasis del calcio, pero actualmente se sabe que tiene un papel modulador en el sistema inmune.
- **Defensinas:** péptidos catiónicos, con un peso molecular de 3.5-4.5 kDa. Como se comentó previamente, pertenecen al grupo de los PAM ricos en cisteína. Sus seis residuos de cisteína forman tres puentes disulfuro intramoleculares característicos, cuyo espaciamiento, en conjunto con la estructura molecular del péptido origina 3 clases de defensinas: α -defensinas, β -defensinas, θ -defensinas. Las alfa-defensinas se encuentran en los gránulos azurófilos de neutrofilos y han sido denominadas como α -defensinas denominadas HNP-1 a HNP-4 (HNP, del inglés “human neutrophil peptides”). Existen otras 2 alfa-defensinas denominadas, defensinas humanas 5 y 6, se encuentran en las células de Paneth en el intestino delgado, y en el tracto urogenital femenino. Referente a las beta-defensinas, en el ser humano se conocen hasta el momento seis β -defensinas, hBD-1 a hBD-6. Las θ -Defensinas únicamente han sido aisladas de leucocitos de primates no humanos. Entre las más importantes de este grupo se encuentran la θ -defensina 1, aislada del modo Rhesus, y la retrociclina 2.

- **Epitelio respiratorio:** tejido formado por una o varias capas de células unidas entre sí que puestas recubren todas las superficies libres del organismo, y constituyen el revestimiento interno de las cavidades, órganos, huecos, conductos del cuerpo y la piel y que también forman las mucosas y las glándulas. El epitelio respiratorio es aquel que recubre la cavidad nasal, nasofaringe, laringe, traque, bronquios y bronquiolos. Se constituye de distintos tipos de células epiteliales como las cilíndricas ciliadas, basales, caliciformes, en cepillo y granulosa, siendo las del primer tipo las más frecuentes.
- **Inmunohistoquímica:** corresponde a un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración.
- **Lipopolisacáridos:** polímeros complejos con restos de ácidos grasos como parte lipófila y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos, que forman la parte mayoritaria de la capa externa de la membrana externa de bacterias Gram negativas. En su conjunto, forman una capa protectora hidrófila en torno a la célula bacteriana que no puede ser atravesada por moléculas lipófilas. El lipopolisacárido es una toxina termoestable, resistente incluso a la esterilización en autoclave, liberada por las bacterias gram negativas al morir y lisarse. Su antígeno provoca un amplio espectro de efectos fisiopatológicos: cuando la cantidad en sangre es suficiente, el lipopolisacárido produce la muerte en una o dos horas, debido a shock irreversible.
- **Mucosa nasal:** La mucosa o membrana mucosa es un tipo de tejido que reviste la cavidad nasal. La mucosa tiene dos tipos de células: Células ciliadas/vellosas y células nerviosas olfativas. Desde un punto de vista histológico, consta de dos partes. La primera, en contacto con el aire, es la parte superficial, y se denomina epitelio. La segunda, en contacto con el hueso, se denomina tejido conjuntivo. Es en esta parte profunda o tejido conjuntivo, donde se hallan unas glándulas, que son las responsables de la secreción del moco nasal.
- **Péptidos antimicrobianos:** péptidos catiónicos que protegen al huésped contra una gran variedad de microorganismos. Estos péptidos se encuentran en diferentes especies, incluidas las bacterias, insectos, plantas, vertebrados (incluyendo mamíferos). Hasta la fecha se conocen poco más de 1500 péptidos antimicrobianos. En los mamíferos estos péptidos se expresan en las barreras epiteliales, donde previenen la colonización de microorganismos patógenos. También se encuentran almacenados en los gránulos de fagocitos, donde asisten en la eliminación de aquellos microorganismos fagocitados. Además de su efecto antimicrobiano se ha descrito que poseen otras funciones incluidas la neutralización de endotoxinas, quimiotaxis, e inmunorregulación.
- **Poliposis nasosinusal:** enfermedad inflamatoria caracterizada por la presencia de neoformaciones benignas de la mucosa nasosinusal, que se asocia con frecuencia a otras enfermedades en las cuales también hay inflamación (asma, rinosinusitis crónica, fibrosis quística). En la mayoría de los casos los pólipos se originan en la mucosa de los senos etmoidales. Estas neoformaciones crecen obstruyendo los orificios de comunicación entre senos paranasales y cavidad nasal.

- **Receptores tipo “toll” (TLR):** Los receptores tipo Toll (o *Toll-like receptor* TLRs) son una familia de proteínas transmembranas de tipo I que forman parte del sistema inmunitario innato. son los responsables del reconocimiento de varias vías de patrones de reconocimiento de patógenos (PAMPs *pathogen-associated molecular patterns*) expresados por un amplio espectro de agentes infecciosos. Estos receptores son homólogos a los encontrados en *Drosophila* y que fueron llamados Toll. Su función, en resumen, es el reconocimiento del patógeno y la estimulación de la respuesta inmunitaria contra dichos patógenos. después de las defensinas (un tipo de péptido antimicrobiano), pueden ser el componente del sistema inmune más antiguo. Estudios con varios TLRs demuestran que activan la vía del NF-kB, que regulan la expresión de citocinas, a través de varias moléculas incluyendo el MyD88, TIRAP/Mai y TRF. Hasta el momento se han descrito 10 TLR humanos, los cuales se unen a un amplio rango de ligandos bacterianos. Los componentes de las paredes celulares de bacterias grampositivas (proteoglicanos) y el LAM se unen y activan al TLR2. TLR3 se une a los RNA de doble cadena sintéticos y virales. Los LPS y el ácido lipoteicoico activan TLR4. TLR5 es activado por flagelina. TLR6 es reconocido por TLR2 para el reconocimiento de proteoglicanos. TLR7 y 8 reconocen RNA viral de cadena simple, mientras que TLR9 reconoce los motivos CpG del DNA bacteriano.
- **Respuesta inmune Th1:** tipo de respuesta montada por células T “helper” (ayudantes) de tipo 1 (Th1) que producen INF-gamma, IL-2 y factor de necrosis tumoral beta (TNF-B) los cuales activan macrófagos y son responsables de la inmunidad celular mediada por células. Las respuestas Th1 preferentemente se desarrollan durante las infecciones por bacterias intracelulares.
- **Respuesta inmune Th2:** tipo de respuesta montada por células T de tipo 2 producen IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13, las cuales son responsables de una fuerte respuesta por anticuerpos e inhiben muchas de las funciones del macrófago. Las células Th2 predominan durante las infestaciones por nemátodos gastrointestinales. Este tipo de respuesta inmune ha sido asociado con el desarrollo de procesos alérgicos.
- **Rinitis vasomotora:** La rinitis vasomotora, o rinitis no alérgica idiopática, es una forma no alérgica de enfermedad nasal persistente observada en niños mayores y en adultos, más común en mujeres. Se manifiesta por rinorrea acuosa, obstrucción nasal y drenaje postnasal. Los síntomas se desencadenan con cambios mínimos de temperaturas en el aire o en la humedad ambiental, olores fuertes, humo de cigarrillo.
- **Síndrome de SAMTER:** proceso inflamatorio en las vías aéreas superiores e inferiores, en donde originalmente se describió la triada clásica de poliposis nasal, asma e intolerancia a la aspirina; en la actualidad se reconoce una cuarta característica: la sinusitis hipereosinofílica crónica hiperplástica. Su etiología es desconocida, pero fue descrita por primera vez por Widal en 1922 cuando describió una asociación entre la presencia de asma, poliposis nasal e hipersensibilidad a la aspirina. Posteriormente en 1960 Samter publicó artículos sobre esta enfermedad y desde entonces adquirió el nombre de triada de Samter o Síndrome de Samter. A través del tiempo, ha recibido otros nombres como asma inducida por aspirina, intolerancia a la aspirina, y enfermedad respiratoria exacerbada por aspirina entre otros.
- **Sonda Foley:** tubos flexibles, generalmente de látex, que se pasan a través de la uretra y hacia dentro de la vejiga con el propósito de drenar la orina. Quedan retenidos por medio de un globo en la extremidad del catéter que se infla con agua estéril.

XIII. ABREVIATURAS

CMI	Concentración mínima inhibitoria.
DAB	Diaminobencidina.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
ELISA	acrónimo del inglés “ <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> ”.
F3	Fórmula 3 de bacterias inactivadas. IPI ASAC.
FPRL1	Receptor semejante el péptido formilo 1.
hBD	Del inglés “human beta defensin”.
hCAP-18	Del inglés “human cationic antimicrobial peptide-18”.
HNP	Del inglés “human neutrophil peptide”.
IFN	Interferon.
IL	Interleucina.
LAM	Lipoarabinomanan.
LL-37	Catelicidina.
LPS	Lipopolisacáridos.
LTA	Ácido lipo teicoico.
MCP	Protein quimioatrayente de monocitos.
PAM	Péptido antimicrobiano.
PBS	Del ingles “Phosphate buffered saline”.
PCR	Reacción en cadena polimerasa.
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted. (CCL5)
RNA	Ácido ribonucleico.
SBA	Albúmina sérica bovina.
TLR	Del inglés “Toll-like receptor”.
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa.
UI	Unidades internacionales.
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana.