

Metaloproteasas de matriz (MMPs) y su asociación a tuberculosis

Mario Alberto Flores-Valdez,* Jeannette Barba**

*Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco, A.C., Biotecnología Médica y Farmacéutica.

** Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Departamento de Salud Pública.

Matrix metalloproteases and their association to tuberculosis

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains as the single most relevant bacterial infectious disease worldwide, causing nearly eight million new cases annually, with an estimated death toll close to two million people per year. The World Health Organization estimates that one third of the world population is latently infected with Mycobacterium tuberculosis (Mtb). Latent TB reactivation remains as the most common cause of new cases of active TB, given inflammation, necrosis and pulmonary cavitation lead to tissue erosion and dissemination to uninfected hosts. Current knowledge of events regulating exacerbated inflammatory responses is scarce. However, participation of components from both the infectious agent and the host is suspected. In this regard, likely candidates to participate in cavitation are matrix metalloproteases (MMPs), a family of proteolytic enzymes required for degrading and reconstructing tissue either in normal or pathological conditions, as well as for processing signaling molecules including cytokines and chemokines. Some studies have reported induction of MMPs genes in response to mycobacterial infection in cellular models, or how inhibiting MMPs action modify the course of tuberculosis infection in murine models.

Key words. Tuberculosis. Matrix metalloproteases. Induction.

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es un problema de salud pública mundial, ya que resulta en ocho millones de casos nuevos y cerca de dos millones de muertes al año. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que dos mil millones de personas (un tercio de la población mundial) están infectados de manera latente con *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). La reactivación de la TB latente es la mayor causa de casos nuevos de la enfermedad activa, debido a la inflamación, necrosis y formación de cavidades o cavernas en el pulmón, que resultan en la diseminación de bacilos a personas no infectadas. En la actualidad se desconoce qué factores conducen a la persona enferma a sostener una respuesta inflamatoria exacerbada, con el concomitante daño tisular. Sin embargo, se sospecha la participación de componentes tanto de la bacteria como de la persona infectada. Un ejemplo en este último caso es el de las metaloproteasas de matriz (MMPs), que son una familia de enzimas que ejercen acción proteolítica y participan en la destrucción y remodelación de tejido en procesos normales o bien patológicos de origen infecto-contagioso o no, así como en el procesamiento de numerosas moléculas de señalización incluyendo citocinas y quimiocinas. Existen estudios donde se ha encontrado alteración en la producción de MMPs en respuesta a la infección con micobacterias en modelos de cultivos celulares, o bien donde la inhibición de amplio espectro de estas enzimas modifica el curso de la infección por *M. tuberculosis* en modelos murinos.

Palabras clave. Tuberculosis. Metaloproteasas de matriz. Inducción.

INTRODUCCIÓN

Después de la infección inicial, las células del sistema inmune rodean a los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* (Mtb), formando un granuloma. En este punto se establecen una compleja red de interacciones que en 60-70% de las personas resulta en

un equilibrio que conduce a la persistencia de la micobacteria, sin signos clínicos de la enfermedad, dando lugar así a la infección latente. Durante el transcurso de la vida de la persona latentemente infectada, puede ocurrir la reactivación, con licuefacción, cavitación y consecuente disfunción pulmonar. Las señales que disparan estos eventos inflamatorios

son aún desconocidas, pero existe evidencia que sugiere la participación de moléculas tanto de la bacteria como del ser humano.¹⁻⁴ El drenado de las lesiones hacia los bronquios ocasiona un estímulo de tos que produce aerosoles, que resultan en la expulsión de la micobacteria con la consecuente transmisión de la TB. Así pues, la inflamación debe considerarse como la causa inicial tanto de la disfunción pulmonar como de la diseminación de la epidemia.

CLASIFICACIÓN, FUNCIONES Y
REGULACIÓN DE LAS METALOPROTEASAS

Las metaloproteasas son miembros del grupo de las proteasas que posee un ión zinc y un residuo de metionina conservados en el sitio activo.^{5,6} La familia de las metaloproteasas incluye las subfamilias M10A, la M10 y la MA.⁷ La subfamilia MA está formada por las ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, por sus siglas en inglés) y las metaloproteasas de matriz (MMPs). Se conocen 25 endopeptidasas tipo MMP en ratón y 24 en humanos.⁸ Las MMPs de mamífero comparten una estructura conservada que consiste en un dominio catalítico y un prodominio autoinhi-

bitorio. El prodominio contiene un residuo conservado de cisteína que coordina al Zn²⁺ en el sitio activo para inhibir la catálisis. La mayoría de los miembros de la familia de MMP también contienen un dominio de hemopexina, unido a su carboxilo terminal que contribuye al reconocimiento del sustrato, a la activación de la enzima, la localización de la proteasa, la internalización y la degradación.⁹

De origen, las MMPs se consideraron enzimas que degradaban componentes estructurales de la matriz extracelular (ECM). Sin embargo, la proteólisis por MMPs puede:

- Crear espacio para que las células migren.
- Producir fragmentos específicos de un sustrato con actividad biológica independiente.
- Regular la arquitectura tisular a través de efectos en la matriz extracelular y en las uniones intercelulares y activar, desactivar o modificar la actividad de moléculas de señalización, tanto directa como indirectamente.¹⁰

Los sustratos de las MMP incluyen factores de crecimiento peptídicos, receptores de tirosina cinasa, moléculas de adhesión celular, citocinas y quimiocinas, así como otras MMPs y proteasas no relacionadas (Cuadro 1). Asimismo, los sustratos sirven para clasificar a las MMPs (Cuadro 2).

En el pulmón, uno de los factores más importantes en la recuperación de la enfermedad o daño físico es la correcta homeostasis de células inflamatorias. Dado que las MMPs intervienen en varias etapas de promoción de rearrreglos tisulares, la inhibición de las MMPs podría parecer una terapia atractiva. Sin embargo, antes de que esto ocurra, necesitamos entender sin ambigüedades su contribución al inicio y progresión de la enfermedad. El estudio de las familias de enzimas es un reto en la era post-genómica, interesada en cuantificar diferencias globales en los niveles de expresión de proteína para asignar fun-

Cuadro 1. Aspectos fisiológicos relevantes de las metaloproteasas de matriz.

Funciones biológicas	
• Creación de espacios para migración celular.	
• Producción de compuestos bioactivos.	
• Regular arquitectura tisular.	
Sustratos	
• Factores de crecimiento peptídicos.	
• Receptores tirosina-cinasa.	
• Moléculas de adhesión celular.	
• Citocinas y quimiocinas.	
• Otras metaloproteasas de matriz.	

Cuadro 2. Clasificación de metaloproteasas de matriz de acuerdo a sus sustratos.

Colagenasas	Gelatinasas	Estromelisin	Otros sustratos
MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-19
MMP-8	MMP-9	MMP-10	MMP-21
MMP-13		MMP-11	MMP-23A
			MMP-23B
			MMP-27
			MMP-28
Matrilisinas	Metaloelastasa	Enamelisina	
MMP-7	MMP-12	MMP-20	
MMP-26			

ción en las redes que forman los procesos normales y patológicos. Las MMPs están sujetas a numerosas formas de regulación postraducciona*l in vivo*.⁹ incluyendo producción de zimógenos inactivos e inhibición por proteínas endógenas (p.ej. TIMPs), inhibidores tisulares de metaloproteasas de matriz.¹¹

MMPs Y TUBERCULOSIS

Participación de
MMPs en la génesis de la TB

A la fecha, existen pocos estudios donde se aborda la participación de MMPs asociadas a TB, los cuales tienen, incluso, resultados discordantes. En uno de ellos, mediante el uso de un inhibidor de amplio espectro (Batimastat, BB-94) de MMPs, se observó que hubo una progresión más rápida de la enfermedad, con una deficiencia en la secreción de IL-1 e IL-2 y un exceso relativo de IL-4, es decir, se produce una desviación de la respuesta inmune, del perfil protector Th1 al perfil no protector tipo Th2.¹² En otro estudio, la inhibición de MMPs con el mismo compuesto promovió la formación de granulomas en etapas tempranas de la infección, lo que contribuiría al control de la progresión de la enfermedad,¹³ sin embargo, en un estudio más, BB-94 redujo la diseminación hematógena bacteriana,¹⁴ sugiriéndose entonces que la actividad de MMPs puede contribuir a la diseminación micobacteriana, al facilitar la erosión de los alvéolos, y no al control como se sugiere por su papel en la promoción del perfil protector Th1 según el estudio de Hernández Pando en 2000. La inminente disponibilidad de inhibidores específi-

cos de cada metaloproteasa podría ayudar a resolver este dilema. Por otro lado, la infección con Mtb de ratones transgénicos, carentes de genes de MMPs particulares,¹⁵ facilitarían el análisis directo de su participación en TB. En contraparte, en modelos experimentales de TB, Mtb indujo la producción de MMP-2 y MMP-9 en ratones infectados¹⁶ y la infección de macrófagos incrementó la secreción de MMP-9¹⁷ (Cuadro 3). Es preciso mencionar que es prácticamente imposible inferir, a partir de estos estudios, una participación clara de las MMPs como integrantes de una respuesta de contención o diseminación bacteriana, debido a que no se analizó el papel de las MMPs individualmente, y que los modelos de infección y tratamiento con BB-94 fue distinto en los trabajos de Hernández Pando e Izzo, de modo que se hace más enfática la necesidad de evaluar puntualmente el papel de MMPs en el desarrollo o contención de la TB en el contexto del ser humano. La determinación de niveles circulantes de las distintas MMPs en lavados broncoalveolares podría ser una manera, si bien relativamente indirecta, de conocer si hay aumento en personas con TB activa, pulmonar o diseminada. La limitante de este acercamiento viene dada por el desconocimiento de la vida media o estabilidad de cada MMP, es decir, quizá las de mayor relevancia en la infección, aún de producirse abundantemente, podrían degradarse de manera rápida y pasar desapercibidas en un análisis como el propuesto. También podría obtenerse información útil de comparar los niveles de producción de MMPs y TIMPs ante la infección de Mtb sobre macrófagos humanos y murinos y definir hasta qué punto se podría extrapolar entre ambas especies, de-

Cuadro 3. Participación de metaloproteasas de matriz en tuberculosis.

Parámetro	Resultado	Referencia
Uso de inhibidor de amplio espectro BB-94 en ratones infectados	Progresión más rápida de TB en ratones ↓IL-1 e IL2 y ↑IL4. Promoción de granulomas tempranos. Reducción de diseminación hematógena.	Hernández-Pando <i>et al</i> , 2000 Izzo <i>et al</i> , 2004 Taylor <i>et al</i> , 2006
Infección en ratones	↑MMP-2 y MMP-9	Rivera-Marrero <i>et al</i> , 2000
Infección en macrófagos	↑MMP-9 Mtb pero no BCG↑ MMP-1 ↑MMP-1, MMP-3, MMP-7 y MMP-10	Quiding-Jarbring <i>et al</i> , 2001 Elkington <i>et al</i> , 2005 Hrabek <i>et al</i> , 2002
Inmunohistoquímica de granulomas linfáticos	MMP-9 presente y poco TIMP-1	Price <i>et al</i> , 2003
Niveles en efusiones pleurales	MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9 TB > falla cardíaca aguda	Hoheisel <i>et al</i> , 2001 Park <i>et al</i> , 2005
Líquido céfalo-raquídeo de enfermos	Alto MMP-9 con TIMP-1 no alterado.	Prince <i>et al</i> , 2001
Polimorfismo en MMP-1 en pacientes taiwaneses	Asociado a TB endobronquial pero no asociado a TB pulmonar.	Kuo <i>et al</i> , 2007

bido a la diferencia en el número de genes de metaloproteasas, o bien definir si cepas de diferentes familias de *Mtb* tienen capacidades iguales o distintas de inducir MMPs o sus inhibidores. De igual modo, resultaría muy relevante definir qué moléculas bacterianas confieren la capacidad de inducir la síntesis de enzimas como las MMPs.

MMPs y cepas micobacterianas

En este sentido, en 1996 se encontró que el lipoarabinomano (LAM), un componente muy relevante de la pared celular de *Mtb*, incrementa la expresión de MMP-1 y MMP-9 en la línea celular humana THP-1,¹⁸ datos confirmados y consolidados por el hallazgo de abundante mRNA de MMP-9 en células aisladas de lavados broncoalveolares (BAL) de pacientes con TB pulmonar activa.¹⁸ Respecto al papel que juega la micobacteria en la inducción de MMPs, ya se mostró que *Mtb* posee componentes ausentes de la cepa vacunal *M. bovis* BCG, que conducen a un aumento de la producción de MMP-1,³ lo que indica variaciones potenciales de cepa a cepa, una idea soportada por el conocimiento de que, en el modelo animal del ratón, aislados clínicos de *Mtb* que pertenecen a distintas familias, producen diferentes grados de respuesta inflamatoria y distinta mortandad,¹⁹ y sólo recientemente se demostró que un elemento ausente de BCG y presente en *Mtb*, la proteína inmunogénica ESAT-6, induce la secreción de MMP-9 en células epiteliales circundantes a los macrófagos infectados, promoviendo el reclutamiento de más macrófagos y la formación de granulomas en un modelo de pez cebra.²⁰ Desde luego sería oportuno definir si en la clínica hay una correlación entre producción de ESAT-6 en pacientes con TB activa y niveles de MMP-9 idealmente *in situ*, donde puede asumirse que existirá una correlación directa, basados en este estudio y en el de Chang, *et al.* de 1996. Así mismo, determinar el tipo de micobacteria presente en un paciente de TB y posibles polimorfismos en sus genes de MMPs ligados a distintos grados de severidad de daño pulmonar es muy relevante para establecer biomarcadores de propensión a daños severos ante infección. Un antecedente medianamente relacionado viene dado por el hallazgo de que ciertos polimorfismos en el gen SLC11A1 (anteriormente conocido como NRAM) se asociaban con la incidencia de casos de TB resistente a múltiples antibióticos (MDR TB) en pacientes japoneses,²¹ si bien la reducida cohorte de estudio no permite extender las conclusiones más allá, se trata de polimorfismos

en genes distintos de MMPs y la identificación genética de la micobacteria no se realizó (Cuadro 3).

MMPs y gravedad del daño pulmonar en TB

Un aspecto largamente observado en la clínica y confirmado por la microbiología, es que pueden presentarse casos graves de TB, involucrándose regiones del pulmón donde existe una baja o nula carga bacteriana viable, sugiriendo que la inmunidad de la persona infectada y las redes intercelulares pueden conducir a la secreción de MMPs y el consecuente daño al órgano. Consistente con esta idea, son los hallazgos obtenidos por inmunohistoquímica de los granulomas tuberculosos de nódulos linfáticos, que muestran extensas zonas de producción de MMP-9 con expresión mínima de TIMP-1; esto, a pesar de la presencia de un reducido número de micobacterias.²² En el único estudio de carácter global efectuado hasta la fecha, se analizó la expresión genética de MMPs y TIMPs en macrófagos humanos infectados por *Mtb*, donde se encontraron niveles aumentados de MMP-1, MMP-3, MMP-7 y MMP-10 en respuesta a la infección, mientras que la secreción y la expresión genética de MMP-9, previamente considerada muy relevante por los estudios ya citados, permanecieron sin cambio, mostrando que la regulación de MMP difiere entre líneas celulares humanas, monocitos no diferenciados, macrófagos y pez cebra. Así mismo, los niveles circulantes de MMP-9 correlacionaron con la severidad de la TB, siendo mayores en aquéllos con casos más severos de la enfermedad.²³ En efusiones pleurales de pacientes con TB, se encontraron niveles más altos de MMP-1, 2, 8 y 9 que en pacientes con falla cardíaca aguda;^{24,25} mientras tanto, en casos de meningitis tuberculosa se reportaron altas concentraciones de MMP-9 en líquido cefaloraquídeo, sin incremento en los niveles de TIMP1.²⁶

En todas estas investigaciones, no obstante, ha faltado en gran medida definir cuál es la participación de componentes específicos de la micobacteria, que si bien son inductores de la producción de MMPs, debido a la variedad de líneas celulares y distintos modelos animales utilizados, cabe preguntarse si los componentes micobacterianos serán inductores *per se*, si existen micobacterias que induzcan una respuesta de MMPs más agresiva o bien si debe existir adicionalmente una condición o predisposición genética, posiblemente asociada a polimorfismos, que incidan en la respuesta inmune exacerbada ante estímulos en otras circunstancias no significativos. En este orden de ideas, recientemente se publi-

có un estudio con pacientes Taiwaneses de TB, donde se encontró una asociación del polimorfismo 1G en MMP-1 con casos de TB endobronquial, no encontrada en casos de TB pulmonar, y que promovía un riesgo mayor de estenosis traqueobronquial.²⁷ Cabe puntualizar que no se aislaron las micobacterias de estos pacientes, a fin de definir si existe una cepa predominantemente ligada a tales eventos de TB endobronquial o no. Estas preguntas y aquellas planteadas en el curso del presente trabajo merecen atención por investigadores y médicos de países donde la TB persista con alta prevalencia.

REFERENCIAS

1. Rook GA, Hernandez-Pando R, Dheda K, Teng Seah G. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends Immunol* 2004; 25(9): 483-8.
2. Dheda K, Booth H, Huggett JF, Johnson MA, Zumla A, Rook GA. Lung remodeling in pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 2005; 192(7): 1201-9.
3. Elkington PT, O'Kane CM, Friedland JS. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin Exp Immunol* 2005; 142(1): 12-20.
4. Flynn JL, Chan J. What's good for the host is good for the bug. *Trends Microbiol* 2005; 13(3): 98-102.
5. Bode W, Gomis-Ruth FX, Stockler W. Astacins, serralsins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett* 1993; 331(1-2): 134-40.
6. Stocker W, Grams F, Baumann U, et al. The metzincins-topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralsins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci* 1995 4(5): 823-40.
7. Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(Database issue): D270-2.
8. Flannery CR. MMPs and ADAMTSs: functional studies. *Front Biosci* 2006; 11: 544-69.
9. Overall CM. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol* 2002; 22(1): 51-86.
10. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 463-516.
11. Fu X, Parks WC, Heinecke JW. Activation and silencing of matrix metalloproteinases. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19(1): 2-13.
12. Hernandez-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Pavon L, Rook G. Treatment with BB-94, a broad spectrum inhibitor of zinc-dependent metalloproteinases, causes deviation of the cytokine profile towards type-2 in experimental pulmonary tuberculosis in Balb/c mice. *Int J Exp Pathol* 2000; 81(3): 199-209.
13. Izzo AA, Izzo LS, Kasimos J, Majka S. A matrix metalloproteinase inhibitor promotes granuloma formation during the early phase of Mycobacterium tuberculosis pulmonary infection. *Tuberculosis (Edinb)* 2004; 84(6): 387-96.
14. Taylor JL, Hattler JM, Dreitz SA, et al. Role for matrix metalloproteinase 9 in granuloma formation during pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection. *Infect Immun* 2006; 74(11): 6135-44.
15. Fanjul-Fernandez M, Folgueras AR, Cabrera S, Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803(1): 3-19.
16. Rivera-Marrero CA, Schuyler W, Roser S, Roman J. Induction of MMP-9 mediated gelatinolytic activity in human monocytic cells by cell wall components of Mycobacterium tuberculosis. *Microb Pathog* 2000; 29(4): 231-44.
17. Quiding-Jarbrink M, Smith DA, Bancroft GJ. Production of matrix metalloproteinases in response to mycobacterial infection. *Infect Immun* 2001; 69(9): 5661-70.
18. Chang JC, Wysocki A, Tchou-Wong KM, Moskowitz N, Zhang Y, Rom WN. Effect of Mycobacterium tuberculosis and its components on macrophages and the release of matrix metalloproteinases. *Thorax* 1996; 51(3): 306-11.
19. Manca C, Tsenova L, Barry CE, 3rd, et al. Mycobacterium tuberculosis CDC1551 induces a more vigorous host response *in vivo* and *in vitro*, but is not more virulent than other clinical isolates. *J Immunol* 1999; 162(11): 6740-6.
20. Volkman HE, Pozos TC, Zheng J, Davis JM, Rawls JF, Ramakrishnan L. Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science* 2010; 327(5964): 466-9.
21. Takahashi K, Hasegawa Y, Abe T, et al. SLC11A1 (formerly NRAMP1) polymorphisms associated with multidrug-resistant tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2008; 88(1): 52-7.
22. Price NM, Gilman RH, Uddin J, Recavarren S, Friedland JS. Unopposed matrix metalloproteinase-9 expression in human tuberculous granuloma and the role of TNF-alpha-dependent monocyte networks. *J Immunol* 2003; 171(10): 5579-86.
23. Hrabec E, Strek M, Zieba M, Kwiatkowska S, Hrabec Z. Circulation level of matrix metalloproteinase-9 is correlated with disease severity in tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6(8): 713-19.
24. Hoheisel G, Sack U, Hui DS, et al. Occurrence of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in tuberculous pleuritis. *Tuberculosis (Edinb)* 2001; 81(3): 203-09.
25. Park KJ, Hwang SC, Sheen SS, Oh YJ, Han JH, Lee KB. Expression of matrix metalloproteinase-9 in pleural effusions of tuberculosis and lung cancer. *Respiration* 2005; 72(2): 166-75.
26. Price NM, Farrar J, Tran TT, Nguyen TH, Tran TH, Friedland JS. Identification of a matrix-degrading phenotype in human tuberculosis *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol* 2001; 166(6): 4223-30.
27. Kuo HP, Wang YM, Wang CH, et al. Matrix metalloproteinase-1 polymorphism in Taiwanese patients with endobronchial tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2008; 88(3): 262-7.

Reimpresos:

Dr. Mario Alberto Flores-Valdez

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco, A.C.,
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Av. Normalistas 800,
Col. Colinas de la Normal,
44270, Guadalajara, Jal.
Phone: (+52) 33334-55200, ext.: 1301.
Fax: (+52) 333345-5245
Correo electrónico: floresvz@yahoo.com y
floresv@ciatej.net.mx

Recibido el 10 de noviembre de 2009.

Aceptado el 18 de marzo de 2010.