

# MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES EMPLEADOS POR MICOBACTERIAS EN LEUCOCITOS POR *Mycobacterium tuberculosis* Y SUS FRACCIONES

Alma Y. Arce-Mendoza\*, Adrián G. Rosas-Taraco\*, Mario C. Salinas-Carmona\*, Carlos Orozco Salas\*\*.

\*Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León (Nuevo León, México)

\*\*Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (Nuevo León, México)

E-mail: [aarce@ccr.dsi.uanl.mx](mailto:aarce@ccr.dsi.uanl.mx)



## Introducción

La tuberculosis es una enfermedad considerada como un problema de salud mundial causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Actualmente se conoce que una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada con el bacilo de la tuberculosis. La infección inicia con la entrada del bacilo de la TB en el cuerpo, la bacteria ingresa a través del tracto respiratorio al inhalar núcleos de saliva que contienen micobacterias, las cuales alcanzan un tamaño entre 1–2  $\mu$ m o menos. La enfermedad depende del establecimiento y de la proliferación de bacilos virulentos y de la propia respuesta del huésped. Una vez la bacteria en el pulmón,

pueden desencadenarse cuatro escenarios: 1) una respuesta inicial del hospedero que permite matar a todos los bacilos efectivamente, por lo tanto la persona no desarrolla TB; 2) el microorganismo comienza a multiplicarse inmediatamente después de la infección, causando una TB primaria; 3) el bacilo llega y se establece pero no causa enfermedad, alcanzando un “equilibrio” con el huésped; tales pacientes tienen una enfermedad latente; finalmente 4) estos microorganismos latentes pueden eventualmente crecer y causar la enfermedad de TB reactiva cuando se rompe ese equilibrio (1). Una vez que la micobacteria entra al organismo se encuentra con el sistema inmune innato, principalmente, con los fagocitos mononucleares y componentes de complemento; la micobacteria opsonizada por los componentes de complemento (C3b) o no opsonizada interacciona con receptores expresados sobre la superficie de los fagocitos mononucleares que reconocen patrones moleculares de la bacteria, los cuales median la fagocitosis de la micobacteria (2). Lo anterior es un paso primordial en la activación de la respuesta inmune celular y humoral (respuesta inmune adquirida).

Existen una diversidad de moléculas que pueden reconocer patrones moleculares de Mtb, entre las cuales están: a) los receptores para componentes de complemento, b) receptores Fc $\gamma$ , c) CD14, d) receptores de manosa, e) receptores para proteína surfactante A, f) DC-SIGN, etc (3,4). Un receptor importante en la toma de la micobacteria por el macrófago es el receptor de complemento tipo 4 (CR4) o CD11c, el cual puede mediar la toma de la bacteria de manera opsónica o no-opsónica. La micobacteria forma un complejo con el componente de complemento C2a, este complejo escinde al componente C3 del complemento, lo cual resulta en la opsonización de la bacteria por C3b y su reconocimiento por el macrófago (5). Sin embargo, existen también evidencias de que la unión a CD11c de *M. tuberculosis*, puede ser de manera no opsónica, esto fue demostrado adicionando anticuerpos monoclonales anti-CD11c y observando un bloqueo en la unión de la bacteria a macrófagos derivados de monocitos. Lo anterior fue corroborado por experimentos de transfección de células de ovario de hámster chino (CHO) con DNAC de CR4, las células transfectadas adquirieron la capacidad de expresar en su superficie el receptor CR4 permitiendo la unión de *M. tuberculosis* (6). El receptor CD14 es una proteína de membrana de 55 kDa unida a un fosfatidilinositol glucano, la cual se expresa sobre la superficie de monocitos, macrófagos, células de microglía y leucocitos PMN. Esta molécula se considera un receptor de alta afinidad para los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram-negativas (7). Se ha demostrado la

participación de CD14 en la unión de las micobacterias a las células de microglía, ya que al adicionar CD14 soluble o anticuerpos monoclonales (Acm) anti-CD14 a un medio celular de macrófagos, se impide la unión de la micobacteria al macrófago (8). El CD14 puede unir al lipoarabinomanana (LAM) de *M. tuberculosis* (H37Ra) y dicha unión estimula al macrófago a producir IL-8, también diversos investigadores describieron que tanto el residuo de arabinosa del LAM (AraLAM) como el de manosa (ManLAM) induce una respuesta distinta en los receptores de manosa y CD14 en células monocíticas humanas y dicha respuesta es dependiente del estado de diferenciación celular (9,10,11). CD40 es una molécula de membrana que juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune humoral y celular, así como también en el cambio de swich de inmunoglobulinas (12), pero en los últimos años se ha reportado que la proteína de choque térmico extracelular de 70 kDa de Mtb puede interactuar con dicha molécula e inducir la producción de quimiocinas, principalmente RANTES (13). Además, la expresión del ligando CD40 (CD40L) se correlaciona directamente con la producción de INF- $\gamma$  estimulada por una infección con *M. tuberculosis* (14).

Por otro lado, los receptores de quimiocinas han sido ampliamente estudiados en los últimos años debido a su papel como moléculas co-adyuvantes en la entrada de ciertos a su célula blanco, un ejemplo clásico es el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (15). Tanto ha sido la importancia de estos receptores de quimiocinas que a finales de los 90's el tropismo del VIH fue clasificado en base al tipo de receptor de quimiocina empleado por el virus. Un virus M-trópico infecta al macrófago a través del receptor de las b-quimiocinas o CCR5, mientras T-trópico infecta células T CD4+ a través del receptor de las a-quimiocinas o CXCR4 y las cepas del VIH dual-trópicas pueden infectar tanto a los macrófagos como a las células T a través de estos receptores (16).

Con todo lo anterior nuestro objetivo fue determinar el papel de Mtb y sus fracciones en la modulación de la expresión de los receptores CD11c, CD14, CD40, CCR5 y CXCR4 en cultivo de leucocitos de sujetos sanos PPD positivos.

### **Material y Métodos**

**El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunoinfectología del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, UANL de Enero del 2003 a Enero del 2004.**

#### **Obtención de la masa bacteriana**

La cepa de *M. tuberculosis* H37Rv fue donada por el Dr. Óscar Rojas Espinosa (Instituto Politécnico Nacional de la Ciudad de México). La cepa fue sembrada en medio sólido de Lowenstein-Jensen a 37° C durante 4 semanas y posteriormente se resembró en medios de cultivo de Proskauer-Beck modificado por Youmans. La biomasa fue obtenida después de 6-8 semanas de incubación, se esterilizó en autoclave a 121°C/1 lb /1hr.

#### **Obtención de la fracción proteica extracelular de *M. tuberculosis* H37Rv**

Los antígenos del filtrado de cultivo fueron separados de la biomasa por centrifugación a 7,000 rpm a 4° C durante 30 minutos. Las proteínas extracelulares fueron concentradas por per-evaporación a un volumen de 100 ml, posteriormente, fueron precipitadas con sulfato de amonio (v/v) a 4°C en agitación constante. El precipitado fue obtenido por centrifugación a 5,000 rpm durante 30 minutos y resuspendido en una solución amortiguadora de sales de fosfatos (PBS) a un pH de 7.2. El material resuspendido se dializó contra agua destilada a 4° C hasta la eliminación de las sales de sulfato de amonio. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (17), se liofilizaron y almacenaron a -20°C.

#### **Obtención de lípidos de *M. tuberculosis* H37Rv**

A partir de la masa bacteriana seca, se pesó y se realizó una extracción con etanol-éter con concentraciones crecientes de éter 1:1 (3 veces), 1:2 (dos veces), 1:3 (una sola vez) en agitación constante por 10 minutos. La mezcla de etanol-éter obtenida se evaporó a temperatura ambiente. La masa bacteriana deslipidizada se dejó secar hasta la evaporación total del éter.

#### **Obtención de la fracción proteica intracelular de *M. tuberculosis* H37Rv**

La masa bacteriana deslipidizada y seca se molió con polvo de vidrio (proporción 1:2) durante una hora, las bacterias lisadas se resuspendieron en amortiguador de Tris-HCl acetato de Mg (0.01 M) a pH de 7.4 y se dejó en agitación por 12 horas a 4° C. Esta mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 minutos a 4° C, el precipitado se eliminó y el sobrenadante se dializó contra agua destilada a 4° C por 24 horas. Se separó una alícuota y se realizó la determinación de proteínas por el método de Bradford (18).

#### **Obtención de la fracción polisacárida de *M. tuberculosis* H37Rv**

La masa bacteriana seca, deslipidizada y molida se resuspendió en 80 ml de KCl 3M y se dejó por 12 horas a 4° C en agitación constante y se dejó sedimentar. El sobrenadante se centrifugó en dos ocasiones a 14,000 rpm por 30 minutos; se recuperó el sobrenadante y se adicionaron 10 volúmenes de metanol, la mezcla se dejó 24 horas a 4° C en agitación constante. Posteriormente, se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 minutos y el precipitado se dejó secar, se disolvió en 30 ml de agua desionizada y se adicionó 10 ml de buffer Tris-HCl 0.01M, pH 7.8 el cual contenía proteinasa K (1.22 µg/ml, Sigma), se incubó durante 1h a 55° C y la reacción se detuvo con ácido tricloroacético 0.11M a 4° C por 1h. Se centrifugó a 10,000 rpm y se dializó contra agua destilada. Por último se separó una alícuota y se determinaron azúcares por el método de Dubois (19), se liofilizó y almacenó a -20° C hasta su uso.

#### **Obtención del plasma rico en leucocitos**

Se extrajeron 20 ml de sangre venosa periférica con heparina como anticoagulante de 10 sujetos sanos PPD positivos. La sangre obtenida se transfirió a tubos cónicos estériles, se centrifugó durante 30 minutos a 550 rpm, se recuperó el plasma rico en leucocitos, se realizaron lavados y cuenta de leucocitos.

#### **Estimulación de leucocitos con *M. tuberculosis* y sus fracciones**

Los leucocitos fueron ajustados a  $1 \times 10^6$  leucocitos/pozo en placas para cultivo celular de 24 pozos (Costar), las células se incubaron en presencia de Mtb (10 y 50 bacterias/leucocito), sus antígenos (proteínas extracelulares e intracelulares, lípidos y polisacáridos, cada uno a una concentración final de 1mg/pozo) y un control negativo sin estímulo. Las células se incubaron por 24 h en presencia de CO<sub>2</sub> (5%) y humedad (95%) a 37°C.

#### **Expresión de CD11c, CD14, CD40, CCR5 y CXCR4 por citometría de flujo**

Después de 24 h de estimulación con Mtb H37Rv o sus fracciones, las células fueron recuperadas por centrifugación (1200 rpm/10 min) e incubadas con anticuerpos monoclonales específicos para cada receptor celular: anti-CD11c humano, anti-CD14 humano, anti-CD40 humano, anti-CCR5 humano, anti-CXCR4 humano y un control de isotipo para eliminar la fluorescencia inespecífica. Las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, posteriormente, se realizaron 2 lavados con amortiguador de fosfatos pH 7.2 y se centrifugaron a 1200 rpm/10 min en cada ocasión. Finalmente las células fueron resuspendidas en 1 ml de FACS flow y fueron adquiridas y analizadas en el citómetro de flujo marca Beckton Dickinson modelo Calibur empleando el software Cellquest. En el análisis se diferenciaron dos regiones celulares

para su análisis individual (la región de linfocitos y monocitos) de la expresión de receptores y el porcentaje relativo de células que expresan dicho receptor.

### Análisis Estadístico

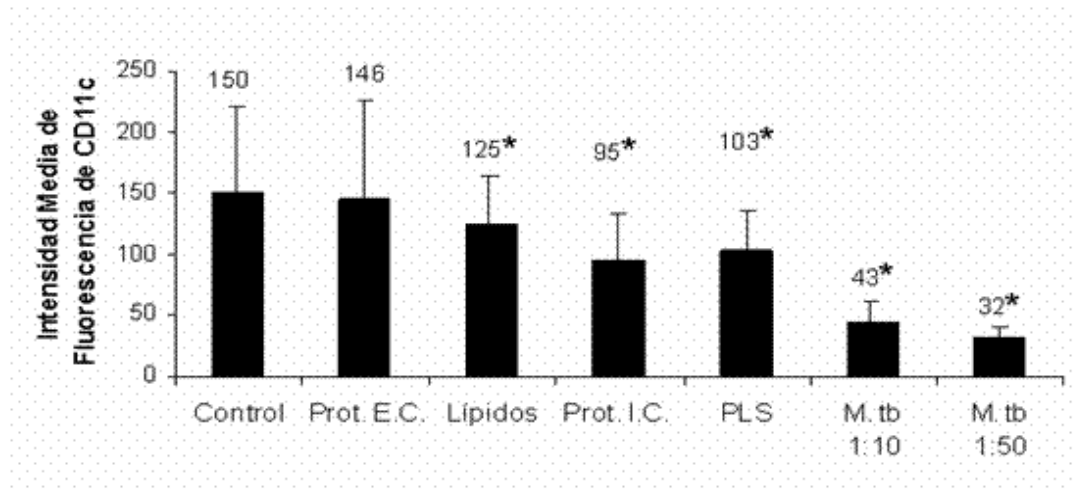
Los resultados fueron analizados empleando la prueba de “t de student” y el software SPSS versión 10.0, considerando diferencias significativas aquella  $P < 0.05$ .

### Resultados

#### Expresión de los receptores empleados por *M. tuberculosis* (CD11c, CD14 y CD40)

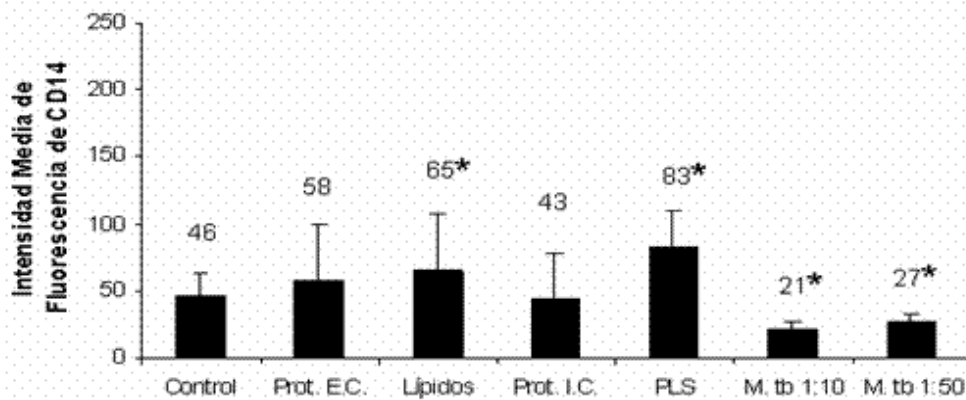
La expresión de CD11c en la región de monocitos fue baja en aquellos cultivos estimulados con la proteína intracelular ( $94.6 \pm 38.9$ ,  $p < 0.05$ ), lípidos ( $124.9 \pm 38.3$ ,  $p < 0.05$ ), polisacáridos ( $102.5 \pm 33.3$ ,  $p < 0.05$ ) de Mtb y el bacilo completo con un efecto dosis dependiente, 10 bacterias/leucocito ( $43.4 \pm 17.7$ ,  $p < 0.05$ ) y 50 bacterias/leucocito ( $31.6 \pm 8.9$ ,  $p < 0.05$ ) versus el control ( $149.9 \pm 70.9$ ) (Ver Figura 1).

**Figura 1. Expresión *in vitro* de CD11c sobre macrófagos después de la estimulación de leucocitos de sujetos sanos PPD-positivos con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, proteínas extracelulares, intracelulares, lípidos y polisacáridos. Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar de la media (DEM). Se observa la disminución de la expresión de CD11c después de la estimulación con Mtb, proteína intracelulares, lípidos y polisacáridos ( $P < 0.05$ )**



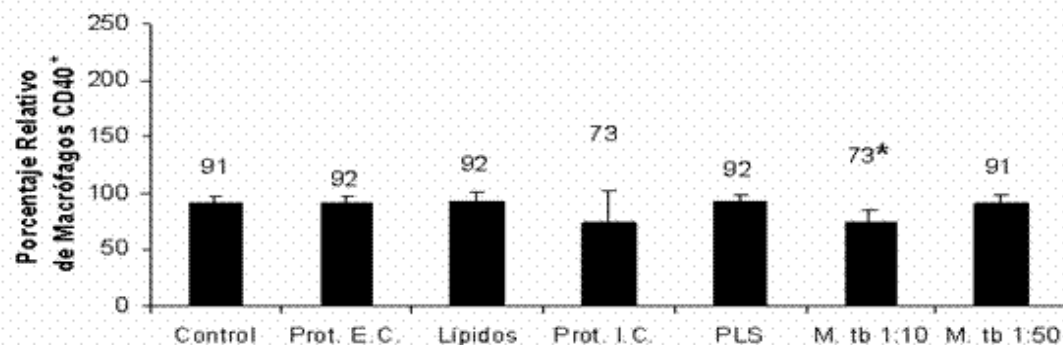
Contrario a lo anterior, la expresión de CD14 se mostró elevada en aquellos cultivos estimulados con lípidos ( $65.4 \pm 42.02$ ,  $p < 0.05$ ), polisacáridos ( $83.07 \pm 25.9$ ,  $p < 0.05$ ), mientras el bacilo completo inhibió o bloqueo la expresión de CD14 ( $p < 0.05$ ) (Ver Figura 2).

**Figura 2. Incremento de la expresión *in vitro* de CD14 sobre macrófagos después de la estimulación de leucocitos de sujetos sanos PPD-positivos con lípidos y polisacáridos; y la disminución por el bacilo completo ( $P < 0.05$ ). Datos representan la media  $\pm$  DEM**



El porcentaje relativo de monocitos portadores de CD40 (CD40<sup>+</sup>) fue disminuido cuando los cultivos fueron estimulados con la bacteria completa (10 bacterias/leucocito) (Ver Figura 3), la intensidad de la expresión de CD40/célula no fue significativa cuando los cultivos fueron estimulados con la bacteria completa o sus fracciones

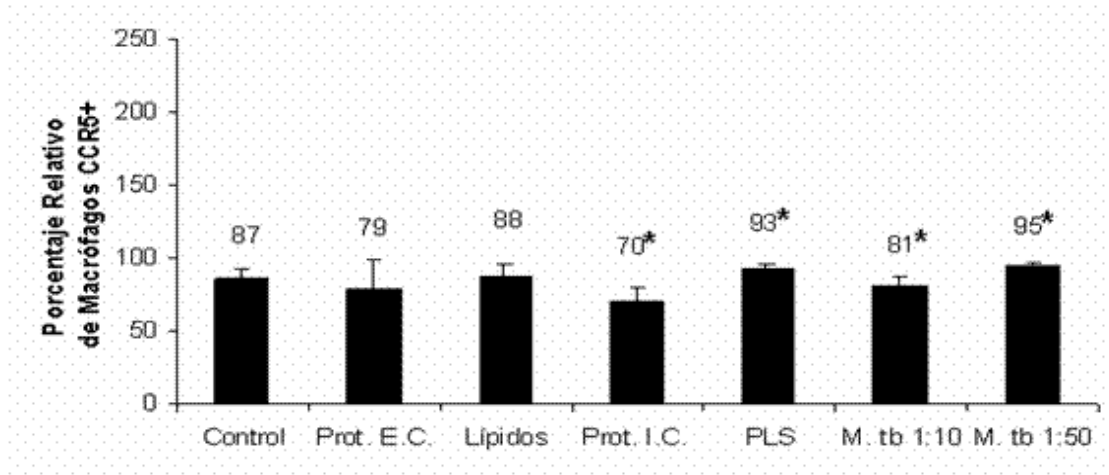
**Figura 3. Se muestra la disminución del porcentaje relativo de macrófagos CD40<sup>+</sup> después de la estimulación de leucocitos de sujetos sanos PPD-positivos con Mtb ( $P < 0.05$ ). Datos representan la media  $\pm$  DEM**



#### Expresión de los receptores de quimiocinas (CCR5 y CXCR4)

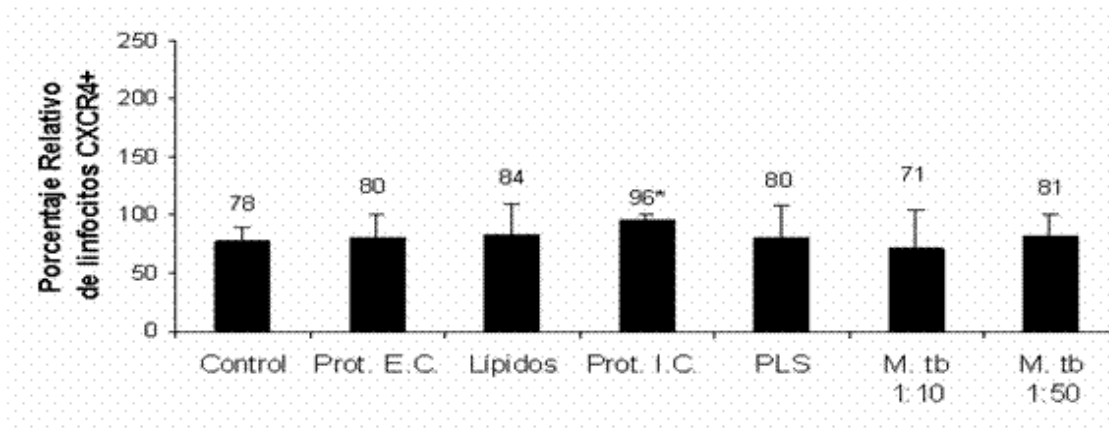
Nosotros observamos que el porcentaje de monocitos CCR5<sup>+</sup> fue elevado en aquellos cultivos estimulados con polisacáridos de Mtb ( $92.7 \pm 3.0$ ,  $p < 0.05$ ), así como, con el bacilo completo a una concentración de 50 bacterias/leucocito ( $95.3 \pm 2.8$ ,  $p < 0.05$ ). Por el contrario, las proteínas intracelulares de Mtb ( $70.4 \pm 9.3$ ,  $p < 0.05$ ) y el bacilo completo a una concentración de 10 bacterias/leucocito ( $81 \pm 6.8$ ,  $p < 0.05$ ) inhibieron el porcentaje de monocitos CCR5<sup>+</sup> (Ver Figura 4).

**Figura 4. Se muestra el incremento del porcentaje relativo de macrófagos CCR5<sup>+</sup> después de la estimulación de leucocitos de sujetos sanos PPD-positivos con Mtb a una dosis de 50 bacterias/leucocito y polisacáridos y disminución después de la estimulación con Mtb a una dosis de 10 bacterias/leucocito y proteínas intracelulares ( $P < 0.05$ ). Datos representan la media  $\pm$  DEM.**



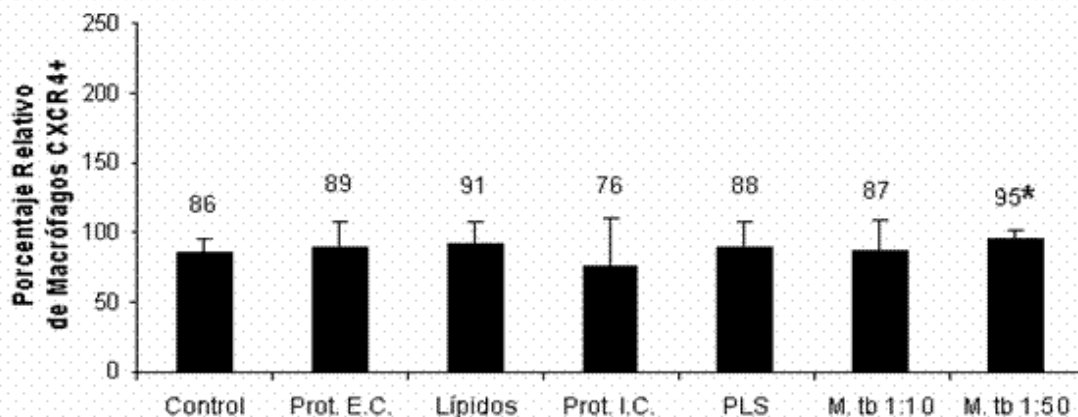
Por otro lado, el porcentaje relativo de linfocitos CXCR4<sup>+</sup> fue incrementado por proteínas intracelulares de Mtb (95.9±4.2, p<0.05), mientras que las otras fracciones de Mtb y el bacilo completo no afectaron el porcentaje de linfocitos CXCR4<sup>+</sup> (Ver Figura 5).

**Figura 5. Se muestra el incremento del porcentaje relativo de linfocitos CXCR4<sup>+</sup> después de la estimulación de leucocitos de sujetos sanos PPD-positivos con proteínas intracelulares (P < 0.05). Datos representan la media ± DEM.**



Las fracciones de Mtb, ni el bacilo completo (10 bacterias/leucocito) no tuvieron efecto sobre el porcentaje de monocitos CXCR4<sup>+</sup> (p>0.05), mientras que la dosis de 50 bacterias/leucocito si incrementaron el porcentaje de monocitos CXCR4<sup>+</sup> (95.2±5.9, p<0.05) versus los controles (85.7±10.7) (Ver Figura 6).

**Figura 6. Se muestra el incremento del porcentaje relativo de macrófagos CXCR4<sup>+</sup> después de la estimulación de leucocitos de sujetos sanos PPD-positivos con Mtb a una dosis de 50 bacterias/leucocito (P < 0.05). Datos representan la media ± DEM.**



## Discusión

La tuberculosis es una enfermedad que se creía controlada en los 80's, pero con la aparición de cepas drogo-resistentes y del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), nuevamente ha emergido como una de las enfermedades más importantes, debido al aumento de casos anuales registrados, por lo tanto ha sido considerada como un problema de salud mundial, En los últimos años se han descubierto patrones moleculares de diversos patógenos capaces de reconocer una variedad de moléculas expresadas sobre las membranas de los macrófagos llamadas receptores. Además, en la interacción huésped-parásito generalmente se trata de establecer un equilibrio entre el parásito-célula para la sobrevivencia de ambos, pero cuando la balanza se inclina hacia el parásito, permite la propagación del mismo y la muerte de la célula huésped. La muerte del parásito ocurre cuando se activa el sistema inmune del huésped y con ello la resolución de la infección (20). Los microorganismos y/o sus componentes ejercen efectos que pueden definir la ruta a seguir entre la infección o resolución del problema, regulando la expresión de moléculas de membrana o suprimiendo la activación del sistema inmune, por lo que en este trabajo se estudió el papel de Mtb y sus fracciones en la expresión de los receptores CD11c, CD14 y CD40 para *Mycobacterium tuberculosis* y los receptores de quimiocinas (CCR5 y CXCR4).

Estudios reciente han demostrado que cadenas simples de glicoproteínas y polisacáridos de Mtb pueden unirse a CD11c (21). En el presente estudio se observó una disminución significativa del CD11c ( $p < 0.05$ ) al estimular las células con lípidos, proteínas intracelulares, polisacáridos, 10 y 50 bacterias por célula. Datos similares fueron encontrados por Desjardin L. *et al.* en el 2002, donde observaron una reducción en la expresión de CD11c después de la infección de macrófagos con Mtb cepa Erman y Mtb H37Ra, pero a diferencia de nosotros, ellos lo observaron a las 72 h y no a las 24 h (22). Posiblemente, lo anterior se deba al tipo de cepas, cultivo celular o dosis empleadas. Para explicar lo anterior nosotros proponemos tres hipótesis: a) Mtb y sus fracciones regulan negativamente la expresión de CD11c para impedir la entrada a otros bacilos y conservar su nicho, para seguir multiplicándose; b) Mtb y sus fracciones podrían estar uniéndose directamente con CD11c e impedir su reconocimiento con el anticuerpo monoclonal; o c) Mtb completo podría estar formando complejos con los componentes del complemento C2a y C3b, permitiendo la unión de estos complejos a CD11c de forma opsonica.

El CD14 es el receptor de diferentes moléculas localizadas en la pared celular de diferentes bacterias tales como el LPS y el LAM (23). En nuestros resultados mostramos que la expresión de CD14 se incremento o fue regulada positivamente por los lípidos y polisacáridos de Mtb, posiblemente mediada LAM y manosas, componentes presentes en la fracción de lípidos y polisacáridos de Mtb. Dicho efecto generaría un microambiente que favorece la unión de la micobacteria a los macrófagos, su posterior internalización y continuar en el foco de infección . Por

otro lado, con el bacilo completo se disminuyó de manera dosis dependiente la expresión de CD14, por lo tanto proponemos que el bacilo se encuentra unido CD14, lo cual impide el reconocimiento por parte del anticuerpo monoclonal; o bien el bacilo produce señales intracelulares que inducen la regulación negativa de CD14 impidiendo la entrada de más bacilos, conservando así su nicho para asegurar su multiplicación.

CD40 es una molécula co-estimuladora cuyo papel es primordial para la activación del sistema inmune y el cambio de expresión genética de las inmunoglobulinas (24). Actualmente, se conoce que la interacción de CD40 con su ligando (CD40L o CD154) es imperativa para la activación del sistema inmune celular en una infección por Mtb (25). El análisis por citometría de flujo nos permite medir la intensidad de fluorescencia con que se expresa un receptor en las células, así como también el porcentaje relativo de células portadoras de dicho receptor. En nuestros resultados observamos que el bacilo completo disminuyó el porcentaje relativo de monocitos CD40<sup>+</sup>, esto podría indicar que en una infección activa se requieren pocas células parasitadas y de esta manera el bacilo desarrolle un mecanismo de sobrevivencia intracelular tratando tal vez de mantenerse vivo (multiplicándose) dentro de su célula huésped (macrófago). Contrario a nuestros resultados fueron reportados por Larkin R. et al. en el 2002, donde ellos observaron un incremento en los macrófagos CD40<sup>+</sup>, cuando fueron infectados con un número menor de bacilos completo de *M. tuberculosis* H37Rv (5 bacterias/célula) (26).

Los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 han adquirido gran importancia desde mediados de los 90's debido a su participación como moléculas cofactoras o coreceptoras para el VIH (27). Nosotros conocemos que la tuberculosis es una enfermedad muy frecuente en pacientes infectados con VIH. En un estudio previo nosotros publicamos que los pacientes con tuberculosis pulmonar tienen niveles elevados de CCR5 y CXCR4, lo cual crea un ambiente propicio para la infección por VIH y su multiplicación (en prensa), por lo tanto nosotros en este estudio tratamos de determinar cual fracción de Mtb induce el incremento de los receptores de quimiocinas. Demostramos que los polisacáridos y el bacilo de Mtb a una dosis de 50 bacterias/leucocito incrementaron el porcentaje de monocitos CCR5<sup>+</sup>, al igual que las proteínas intracelulares incrementaron el porcentaje de linfocitos CXCR4<sup>+</sup> y el bacilo completo (50 bacterias/leucocitos) incrementaron el porcentaje de monocitos CXCR4<sup>+</sup>. Por lo tanto, nosotros proponemos que tanto el bacilo completo, así como, los polisacáridos, proteínas intracelulares son los responsables del incremento de los receptores de quimiocinas en los pacientes con tuberculosis pulmonar; los cuales permiten que los pacientes con tuberculosis pulmonar sean altamente susceptibles a la co-infección por el VIH, por otro lado a los paciente infectado con VIH que lleguen a contraer la co-infección por Mtb, ésta contribuirá a la diseminación viral. Similares a nuestros resultados Wahl S et al en 1998 (28) y Juffermans en el 2000 (29) encontraron un incremento en la expresión de CCR5 por el complejo *M. avium-intracellulare* y el componente LAM de *M. tuberculosis*.

Los hallazgos encontrados en este trabajo, la regulación de la expresión de receptores usados por Mtb y los coreceptores para el VIH por las fracciones de Mtb, son de gran importancia para la salud pública ya que dentro de este crucigrama de la tuberculosis los avances en la investigación básica son de gran importancia para desarrollar nuevas estrategias que puedan co-adyuvar en la resolución de la enfermedad. En trabajos futuros en este campo se enfocarán en la búsqueda de moduladores negativos de la expresión de receptores para disminuir la posibilidad de infección por Mtb y VIH.

## **Resumen**

Existen receptores en las células hospederas que reconocen patrones moleculares que favorecen la internalización de patógenos. Para *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) se encuentran CD11c, CD14 y CD40. Los receptores para a-quimiocinas y b-quimiocinas (CXCR4 y CCR5) son moléculas coreceptoras para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y median su entrada a células CD4<sup>+</sup>. El objetivo del presente trabajo fue determinar si Mtb y/o sus fracciones pueden modular la



expresión de CD11c, CD14, CD40, CXCR4 y CCR5 en cultivo de leucocitos de sujetos sanos PPD-positivos. Observamos una disminución en la expresión de CD11c por Mtb y sus fracciones ( $p < 0.05$ ), excepto por las proteínas extracelulares de Mtb. La expresión de CD14 fue incrementada por los lípidos y polisacáridos ( $p < 0.05$ ), sin embargo Mtb completo inhibió la expresión ( $p < 0.05$ ). Los monocitos CD40<sup>+</sup> se ven disminuidos después de la estimulación con la bacteria completa ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, monocitos CCR5<sup>+</sup> fueron elevados después de la estimulación con el bacilo completo y polisacáridos ( $p < 0.05$ ). Finalmente, los linfocitos CXCR4<sup>+</sup> fueron elevados después de la estimulación con proteínas intracelulares. La bacteria completa incremento el porcentaje de monocitos CXCR4<sup>+</sup> ( $p < 0.05$ ). En conclusión, la micobacteria y algunas de sus fracciones regulan la expresión de receptores probablemente para asegurar su nicho y asegurar su multiplicación. Los resultados con los receptores de quimiocinas demuestran que la infección por Mtb genera un microambiente propicio para la co-infección por VIH.

Palabras clave: Receptores, *Mycobacterium tuberculosis*, Receptores de Quimiocinas, VIH.

### **Abstract**

There are host cell receptors that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that facilitates the entry of intracellular pathogens. In the case of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) the involved receptors are CD11c, CD14, and CD40. Alpha and beta-chemokine receptors (CXCR4 and CCR5) are coreceptors that mediate human immunodeficiency virus (HIV) entry to CD4<sup>+</sup> cells. The purpose of this work is to determine if Mtb or its fractions can modulate the expression of CD11c, CD14, CD40, CXCR4, and CCR5 in leukocytes culture from healthy PPD-positive volunteers. We found a decrease in the expression of CD11c induce by Mtb and its fractions ( $p < 0.05$ ). Extracellular proteins from Mtb cultures induced not change. Lipids and polysaccharides (PLS) increased CD14 expression, but whole Mtb inhibited its expression ( $p < 0.05$ ). CD40<sup>+</sup> monocytes diminished after stimulation with intact bacterial cell. On the other hand, CCR5<sup>+</sup> monocytes increased after whole cell and PLS stimulation ( $p < 0.05$ ). In addition, CXCR4<sup>+</sup> lymphocytes increased after stimulation with intracellular protein from Mtb, while complete bacilli (50 bacteria/leukocyte) increased CXCR4<sup>+</sup> monocytes ( $p < 0.05$ ). In conclusion, Mtb and its fraction regulate the expression of host cell receptors that favor bacterial multiplication. The results in the chemokine receptors demonstrated that Mtb infection creates conditions that facilitates the co-infection by HIV.

Keywords: Receptors, *Mycobacterium tuberculosis*, Chemokine receptors, HIV.

### **Agradecimientos**

Se agradece el apoyo para la realización de este proyecto al fondo PAICYT de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Proyecto SA978-04), así como a la QCB Nereida Méndez Ramírez y QCB Rosario Salazar del Departamento de Hematología.

### **Referencias**

1. Schluger, N.W. and W.N. Rom. 1998. The Host Immune Response to Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 157:679-691.
2. Ernst, J.D. 1998. MINIREVIEW: Macrophage Receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 66: 1277 – 1281.
3. *Idem.*
4. Tailleux, L., O. Schwartz, J.L. Herrmann. 2003. DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J Exp Med.* 197:121-127.

5. Schorey, J.S., M.C. Carroll, E.J. Brown. 1997. A Macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science*. 277:1091-1093.
6. Zaffran, Y., L. Zhang, and J.J. Ellner. 1998. ROLE of CR4 in *Mycobacterium tuberculosis*-Human Macrophages Binding and Signal Transduction in Absence of Serum. *Infect Immun*. 66: 4541 – 4544.
7. Viriyakosol, S., J. Mathison, P. Tobias, and T. Kirkland. 2000. Structure-Function analysis of CD14 as a soluble receptor for lipopolysaccharide. *J Bio Chem*. 275:3144-3149.
8. Peterson, P., G. Gekker, S. Hu, W. Sheng, W. Anderson, R. Ulevitch, P. Tobias, K. Gustafson, T. Molitor, and C. Chao. 1995. CD14 Receptor-Mediated Uptake of Nonopsonized *Mycobacterium tuberculosis* by Human Microglia. *Infect. Immun*. 63(4): 1598-1602.
9. Bernardo, J., A. Billingslea, R. Blumenthal, K. Seetoo, E. Simons, and M. Fenton. 1998. Differential Responses of Human Mononuclear Phagocytes to Mycobacterial Lipoarabinomannans: Role of CD14 and the Mannose Receptor. *Infect Immun*. 66: 28 -35.
10. Roach, T.I., C. Howard, D. Chatterjee, and J.M. Blackwell. 1993. Macrophage activation: lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially induces the early genes c-fos, KC, JE and Tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Immunol*. 150: 1886-1896.
11. Schlesinger, L., S. Hull, and T. Kauffman. 1994. Binding of Terminal Mannosyl Units of Lipoarabinomannan from a Virulent Strain of *Mycobacterium tuberculosis* to Human Macrophages. *J. of Immunol*. 152: 4070-4079.
12. Foy, T.M., A. Aruffo, J. Bajorath, J. Buhlmann, and R. Noelle. 1996. Immune Regulation by CD40 and its Ligand GP39. *Annu Rev Immunol*. 14 (1): 591 – 617.
13. Wang, Y., C. Kelly, J. Karttunen, et al. 2001. CD40 is a cellular receptor mediating mycobacterial heat shock protein 70 stimulation of CC-Chemokines. *Immunity*. 15: 971-983.
14. Samten, B., E.K. Thomas, J. Gong, and P.F. Barnes. 2000. Depressed CD40 ligand expression contributes to reduced gamma interferon production in human tuberculosis. *Infect. Immun*. 68:3002-3006.
15. Fauci, A. 1996. Host factors and the Pathogenesis of HIV-induced Disease. *Nature*. 384: 529-534.
16. Berger, E., R. Doms, E. Fenyö, et al. 1998. A New Classification for HIV-1. *Nature*. 391:240.
17. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72:248-254.
18. *Idem*.
19. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, et al. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem*. 28:350-356.
20. Aderem, A., and Underhill, D.M. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*. 17: 593-623.

21. Mueller-Ortiz, S.L., A.R. Wagner, and S.J. Norris. 2001. Mycobacterial protein HbhA binds human complement component C3. *Infect. Immun.* 69:7501-7511.
22. DesJardin, L.E., T.M. Kaufman, B. Potts, B. Kutzbach, H. Yi, L.S. Schlesinger. 2002. *Mycobacterium tuberculosis*-infected human macrophages exhibit enhanced cellular adhesion with increased expression of LFA-1 and ICAM-1 and reduced expression and/or function of complement receptors, FcγRII and the mannose receptor. *Microbiology.* 148: 3161-71.
23. Viriyakosol, S., *et al.*, *Op cit*
24. Foy, T.M., *et al.*, *Op cit*
25. Samten, B., *et al.*, *Op cit*
26. Larkin, R., C. Benjamin, Y. Hsu, Q. Li, L. Zukoski, and R. Silver. 2002. CD40 Ligand (CD154) does not contribute to lymphocyte-mediated inhibition of virulent *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes. *Infect Immun.* 70: 4716 – 4720.
27. Fauci, A. *Op cit*
28. Wahl, S., T. Wild, G. Peng, *et al.* 1998. *Mycobacterium avium* complex augments macrophage HIV-1 production and increases CCR5 expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95 : 12574 – 12579.
29. Juffermans, N.P., W. Paxton, P. Dekkers, *et al.* 2000. Up-regulation of HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 on CD4+ T cells during human endotoxemia and after stimulation with (myco) bacterial antigens: the role of cytokines. *Blood.* 96: 2649 – 2654.