

00524  
32



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION**

**PARTICIPACION DEL RECEPTOR DE COMPLEMENTO  
TIPO 3 (CR3) EN LA FAGOCITOSIS DE  
*Mycobacterium tuberculosis*.**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLÓGICA  
P R E S E N T A :  
COLIN TORRES DJANA



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# PAGINACIÓN DISCONTINUA

**Jurado asignado:**

**Presidente** Prof. Monica Berenice Heras Chavarria.

**Vocal** Prof. Sonia Mayra Perez Tapia.

**Secretario** Prof. Marco Velasco Velázquez.

**1er. Suplente** Prof. Ruth Bustamante García.

**2o. Suplente** Prof. Gonzalo Castillo Rojas.

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio de Farmacología Celular, Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina.

Este trabajo fue apoyado parcialmente por el proyecto IN230202.

**Asesor del tema**

**Q.F.B. Marco Antonio Velasco Velázquez** \_\_\_\_\_

**Sustentante**

**Diana Colin Torres** \_\_\_\_\_



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Colin Torres Diana

\_\_\_\_\_  
na

FECHA: 10-Abril-2003

FIRMA: \_\_\_\_\_

### **Agradecimientos**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México, por aceptarme en esta institución, porque aquí recibí las mejores enseñanzas para mi vida profesional.**

**A mi asesor, Marco Velasco Velázquez por darme la oportunidad de trabajar contigo, por todo tu apoyo, confianza, conocimientos y amistad por demás que me brindaste.**

**A los miembros del Laboratorio de Farmacología Celular: Dr. Juan Molina, Juanita, Alejandro, Estelita, Charmina, Adriana, por permitirme ser miembro de su equipo, por los consejos, experiencias y amistad.**

## **Dedicatorias**

**A Dios, por guiarme en todo este camino, por todo lo que me has dado en mi vida.**

**A mi papá Juan José, a mi mamá Consuelo, por el amor, consejos, apoyo, regaños, porque son lo más importante para mí, porque gracias a ustedes pude hacer este sueño realidad. Los amo.**

**A mis hermanos Beatriz y Juan José, por quererme tanto, porque sé que cuento con ustedes y los quiero mucho.**

**A Xime, mi niña te quiero mucho.**

**A mis abuelos Juventino (q.e.d.) y Alberto (q.e.d.), sé que están conmigo disfrutando de este logro.**

**A mis abuelas Marías, y a toda mi familia por todo el amor, que he recibido de ustedes.**

**A mi profesor Alejandro Bonifaz, por su amistad.**

**A mis amigos Diana, Efraín, Carmen, Miguel, Samia, Fernando, Sonia, Blanca, Teresa, Salvador, Rafita, Sarahí, Sahid, por compartir conmigo este sueño, por ser parte de mi vida estos años, por todo lo que hemos vivido juntos, las aportaciones que me dejaron, por sus consejos y estar conmigo en las buenas y en las malas. Los quiero mucho.**

**A Jaime, por ser alguien especial.**

## **INDICE**

### **I.- Introducción.**

Tuberculosis.....	2
Epidemiología.....	2
Desarrollo de la infección.....	3
Desarrollo de la enfermedad.....	4
Respuesta inmune durante la enfermedad.....	9
Fagocitosis y respuesta inmune.....	15
Pared celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	17
Fagocitosis de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	17
Receptores fagocíticos a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	18

### **II.- Objetivos..... 20**

### **III.- Información general sobre el tema.**

Características del receptor de complemento tipo 3 (CR3).....	21
Ligandos del receptor de complemento tipo 3 (CR3).....	23
Funciones del receptor de complemento tipo 3 (CR3).....	25
Transducción de señales mediada por receptor de complemento tipo 3 (CR3).....	27
Participación de CR3 en la fagocitosis opsónica de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	29
Participación de CR3 en la fagocitosis no-opsónica de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	32
Participación de CR3 en la infección <i>in vivo</i> .....	36

### **IV.- Conclusiones..... 38**

### **V.- Bibliografía..... 40**

## **I.-INTRODUCCIÓN.**

### **Tuberculosis.**

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que afecta principalmente pulmones, pero también puede afectar a los riñones, huesos, ganglios linfáticos o cerebro. La tuberculosis es producida por bacterias del “**complejo *Mycobacterium tuberculosis***”, que incluye a las especies de *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. microti*, y *M. tuberculosis*. La especie más importante para el hombre, desde el punto de vista clínico, es *M. tuberculosis* (también conocido como bacilo de Koch o de la tuberculosis), un bacilo de 2 a 4 µm de longitud, intracelular, aerobio estricto, de crecimiento lento, no esporulado e inmóvil (Pieters 2001). El deterioro en los servicios de salud, el esparcimiento del virus de la inmunodeficiencia humana y la resistencia de *M. tuberculosis* a fármacos, contribuyen al incremento del número de casos de tuberculosis. Con la finalidad de encontrar algún mecanismo con el cual erradicar a la micobacteria una vez ya establecida en individuo afectado, reinvestigan las características biológicas del agente causal de la enfermedad (Pieters 2001). En este trabajo describiremos la participación del Receptor de Complemento tipo 3 (CR3) en el establecimiento de la infección por *M. tuberculosis*.

### **Epidemiología.**

Para dar una idea de la magnitud del problema, veamos algunas cifras publicadas por la Organización Mundial de la Salud (WHO, GTC, 2001):

- Más de la *tercera parte de la población* se encuentra infectada con alguna cepa del complejo *M. tuberculosis*.
- Cada año *nueve millones* de personas desarrollan la enfermedad. De las cuales, aproximadamente *tres millones* fallecen.
- La tuberculosis figura en el **5º lugar mundial como causa de muerte**, después de las enfermedades cardiovasculares (12 millones/ año), las infecciones respiratorias, el cáncer y las enfermedades diarreicas (5 millones/ año para cada una).
- Está estimado que entre el 2002 y 2020, aproximadamente 1000 millones de personas estarán infectadas, alrededor de 150 millones de personas estarán enfermas, y 36 millones de personas morirán a causa de la tuberculosis.
- La tuberculosis es una de las enfermedades más serias en países en desarrollo.

### **Desarrollo de la infección.**

Existen dos vías principales de entrada para el establecimiento de la tuberculosis:

- Por vía inhalatoria (*M. tuberculosis*), que es la vía más común en nuestros días.
- Ocasionalmente por vía gastrointestinal, al ingerir leche contaminada por *M. bovis* (Pieters, 2001).

En la mayoría de los casos la enfermedad se adquiere por inhalación de núcleos goticulares que llevan microorganismos; usualmente esto lleva implícito el contacto repetido o constante con personas cuyo esputo es positivo para el bacilo. El riesgo de la infección en estos casos no sólo se relaciona con el grado de infectividad de la fuente individual, sino con las defensas del individuo expuesto y la frecuencia de contacto entre ambos. El grado de infectividad de la fuente, en sí mismo, se asocia a distintas

variables, incluyendo la extensión y naturaleza de la enfermedad tuberculosa y la frecuencia de la tos. El desarrollo de cavidades pulmonares es el factor más importante en este sentido, ya que su presencia no implica solamente un aporte mayor de oxígeno al bacilo, que se puede multiplicar rápidamente, sino también una vía de salida fácil a la atmósfera externa.

### **Desarrollo de la enfermedad.**

#### **Tuberculosis Primaria**

##### **-Patogenia y características patológicas**

La bacteria es capaz de sobrevivir y multiplicarse en el interior de los macrófagos, persistiendo durante meses o años en condiciones desfavorables, en un estado inactivo pero viable en el interior del tejido, esto es fundamental para el desarrollo de la enfermedad. La interacción entre la capacidad de supervivencia de los bacilos y la efectividad de los macrófagos para eliminarlos determina la presencia y extensión de la enfermedad. El desarrollo de la enfermedad se manifiesta patológicamente por necrosis y, eventualmente, fibrosis, y está determinado por una reacción de hipersensibilidad mediada por linfocitos (Fraser, 1996). Las personas adquieren la tuberculosis pulmonar primaria, generalmente, al inhalar núcleos goticulares cargados de bacilos que están presentes en el medio ambiente y se transportan por corrientes normales de cualquier habitación. Estos bacilos se depositan en las vías aéreas de transición y alvéolos, generalmente de localización subpleural, donde se multiplican y provocan una reacción inflamatoria. Aunque los macrófagos son capaces de ingerirlos y, en cierto grado, contener los microorganismos, en la mayoría de los casos son incapaces de matarlos. En un corto período de tiempo, sin embargo, sufren alteraciones morfológicas y funcionales que vuelven más eficaces a las células

epitelioides, y comienzan a agregarse en múltiples granulomas de diversos tamaños (Figura 1).

Después de 1 a 3 semanas (coincidiendo con el desarrollo de la hipersensibilidad), los granulomas están ya bien formados y sufren necrosis central. Al progresar la enfermedad los focos necróticos individuales tienden a aumentar, dando como resultado grandes áreas de restos necróticos completamente rodeadas por una banda de histiocitos epitelioides y células gigantes multinucleadas, éstas se rodean de células mononucleares (linfocitos y monocitos) y fibroblastos. Esta reacción inflamatoria permite localizar y, en la mayoría de los casos, prevenir una diseminación de la enfermedad. En este punto, el foco inflamatorio es, con frecuencia, visible, siendo el material necrótico central blando, blanco y de consistencia friable; esta apariencia, conocida como *necrosis caseosa*, es característica de la mayor parte de las formas de necrosis tuberculosa (Fraser, 1996).

El lugar inicial de infección parenquimatosa en la tuberculosis primaria es llamado *foco de Ghon*. Al progresar la enfermedad, puede tanto aumentar como curarse. En este último caso, que es mucho más frecuente, los fibroblastos de la periferia de los focos necróticos proliferan y forman colágena, dando como resultado una cápsula fibrosa que rodea completamente al material necrótico. Con el tiempo se suele desarrollar una calcificación distrófica de tal grado que puede ser vista radiológicamente. A pesar de que la enfermedad es totalmente inactiva en este estadio, con frecuencia quedan organismos viables en el tejido necrótico encapsulado, sirviendo como foco potencial para una reactivación posterior.

Durante la fase precoz de la infección es frecuente la diseminación de microorganismos hacia ganglios regionales por los canales linfáticos, conociéndose como *complejo de Ranke* a la combinación del foco de Ghon y ganglios linfáticos

afectados. El curso de la enfermedad en los ganglios linfáticos es similar al de la lesión del parénquima y consiste en inflamación granulomatosa y necrosis, seguida de fibrosis y calcificación. Sin embargo, típicamente el grado de reacción inflamatoria es mayor en los ganglios que en el parénquima (Fraser, 1996). Los organismos pueden también acceder al torrente sanguíneo y tejidos extrapulmonares por vía linfática o por los vasos pulmonares de la vecindad del foco de Ghon (Figura 1). Aunque tal diseminación hematogena es común, no existen generalmente manifestaciones clínicas de tuberculosis miliar o extrapulmonar en la enfermedad primaria, presumiblemente porque el número de microorganismos que han diseminado es limitado y porque las defensas del hospedero son adecuadas. No obstante, esta dispersión sistémica de microorganismos es extremadamente importante, ya que las diminutas áreas de infección que se establecen quedan como focos potenciales de reactivación tuberculosa meses o años después.

Aunque la curación es la norma de la tuberculosis primaria, en un pequeño número de pacientes la enfermedad local parenquimatosa puede progresar, tanto en el foco de Ghon como en cualquier otra parte del pulmón (usualmente los segmentos apical o posterior de lóbulos superiores). Esta se denomina tuberculosis primaria progresiva y es similar morfológicamente y en su curso a la tuberculosis postprimaria (Fraser, 1996).

#### -Manifestaciones clínicas.

Muy pocos pacientes con tuberculosis pulmonar primaria presentan manifestaciones clínicas. Cuando ocurre, los síntomas consisten en fiebre, tos, anorexia, pérdida de peso, sudoración excesiva, dolor torácico, letargia y disnea. Puede haber síntomas más severos como resultado de una enfermedad pulmonar progresiva, o también por diseminación de la enfermedad hasta localizaciones extratorácicas, incluidas meninges (Fraser, 1996).

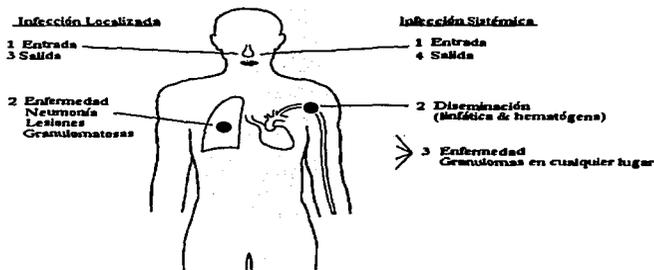


Figura 1.- Patogénesis de la Tuberculosis (Baron, 1996)

TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACIÓN

### Tuberculosis Postprimaria.

La tuberculosis postprimaria tiende a localizarse inicialmente en los segmentos apical y posterior de los lóbulos superiores (Figura 2). Se ha postulado que este hecho se relaciona con la relativamente alta presión parcial de oxígeno en estas zonas, resultando de un alto índice de ventilación-perfusión, o por un mejor drenaje linfático resultante de un flujo arterial pulmonar disminuido. Se sabe que, la mayoría de casos que asientan en esta localización derivan de la reactivación de organismos latentes, pero viables, que diseminaron vía hematogena durante la infección primaria (Fraser, 1996).

Patológicamente, la secuencia de eventos es similar a la de la infección primaria, excepto que la necrosis ocurre antes, como resultado de la presencia de hipersensibilidad previa. Además, a diferencia de la tuberculosis primaria en la que la fibrosis y la curación son la norma, la enfermedad postprimaria tiende a progresar, y los

focos inflamatorios y necróticos aumentan hasta ocupar importantes porciones del parénquima pulmonar. Durante este proceso es frecuente la comunicación con las vías aéreas, lo que origina el drenaje de material necrótico y la formación de cavidades (Fraser, 1996). Como en la tuberculosis primaria, el curso de la enfermedad en este punto depende, en gran medida, de la interacción de las respuestas del hospedero y la virulencia del microorganismo. Cuando la respuesta del hospedero es efectiva, existe una curación gradual con formación de cicatrices parenquimatosas localizadas o extensas, a menudo calcificadas, acompañadas frecuentemente por enfisema adyacente.

Tales cambios pueden ocurrir aislados, pero es más frecuente que aparezcan asociados con focos residuales bien delimitados de parénquima necrótico (aparición conocida como "tuberculosis crónica fibrocásica") (Fraser, 1996). Cuando la virulencia del organismo supera las defensas del hospedero, la enfermedad progresa, tanto localmente (por expansión gradual de la zona de inflamación y necrosis) como a distancia, en otras partes del pulmón o del cuerpo (por diseminación bacteriana por las vías aéreas, linfáticas o torrente sanguíneo). La diseminación de material necrótico líquido desde una cavidad puede dar como resultado una infección tuberculosa en el mismo u otros lóbulos de ambos pulmones. La diseminación de microorganismos por vía linfática o por la vasculatura pulmonar puede dar como resultado una tuberculosis miliar de pulmón, hígado, bazo, médula ósea y muchos otros órganos (Fraser, 1996).

#### -Manifestaciones clínicas.

Cuando existen, los síntomas son inespecíficos y no dirigen la atención a los pulmones. Los más frecuentes son cansancio, debilidad, anorexia y pérdida de peso. En algunos casos, la primera queja del paciente es dolor torácico. La ronquera, generalmente manifestación de afectación laríngea, indica enfermedad activa. La fiebre generalmente no es muy elevada (Fraser, 1996).

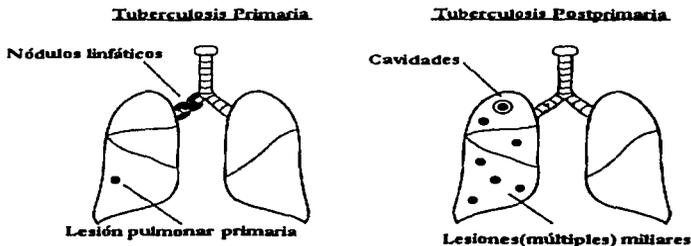


Figura 2.- Diferencias radiológicas entre la Tuberculosis Primaria y la Tuberculosis Postprimaria (Medical Microbiology, 1996, Baron).

**Respuesta inmune durante la enfermedad.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La respuesta inmune montada por el hospedero es crucial en el establecimiento y desarrollo de la tuberculosis. Por esto, es importante entender el papel que tiene el sistema inmune en la infección por *M. tuberculosis*. En el desarrollo de la tuberculosis la respuesta inmune celular que monta el hospedero tiene un papel muy importante ya que de esta dependerá si la enfermedad será primaria o postprimaria o bien, la erradicación de la micobacteria (Schluger, 2001). Por otro lado, la producción de anticuerpos por el hospedero (inmunidad humoral) no contribuye en forma importante en la defensa del hospedero (Schluger, 2001). Los anticuerpos que reconocen antígenos de *M. tuberculosis* únicamente tiene aplicación en el desarrollo de pruebas serológicas para la detección de la enfermedad.

El control de la tuberculosis requiere de la generación de células T y el reclutamiento de células mediadoras de la inflamación que rodeen y contengan a los

macrófagos infectados y que inhiban la diseminación de los bacilos. La respuesta inmune adquirida a la infección de *M. tuberculosis* puede ser dividida en tres fases principales (Saunders, 2000):

- La iniciación y desarrollo de inmunidad celular específica.
- La expresión de inmunidad protectora en el pulmón.
- El mantenimiento de la inmunidad protectora.

Durante estas etapas las células que participan en la respuesta inmune celular montada por el hospedero en la tuberculosis son los macrófagos alveolares, los linfocitos T ( $CD4^+$  o T-cooperadores y  $CD8^+$  o T citotóxicos) y las células NK ("natural killer") (Condos, 1998, Schluger, 1998).

La participación más importante en la defensa del organismo hospedero es la de los linfocitos T  $CD4^+$  (Schluger, 1998). Los linfocitos T  $CD4^+$  (T-cooperadores) están involucrados en el reconocimiento de antígenos que han sido procesados en los fagosomas y presentados en pequeños fragmentos peptídicos en las moléculas de MHC clase II por las células presentadoras de antígeno (monocitos, macrófagos, o células dendríticas). Los linfocitos T  $CD4^+$  pueden diferenciarse en 2 clases con fenotipo diferente: las células Th1, que se caracterizan por producir citocinas como el INF- $\gamma$  e interleucina-2 (IL-2), y las células Th2 que producen citocinas como interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-10 (IL-10). Citocinas como interleucina-3 (IL-3), linfotoxina y el factor estimulante de colonias granulocito - macrófago (GM-CSF) son secretados por ambas clases de células  $CD4^+$  (Schluger, 1998).

Las citocinas producidas por las células Th1, son aquellas que activan a las células fagocíticas e inflamatorias quienes, una vez activas, son capaces de inhibir el crecimiento de la bacteria patógena, generando una inmunidad protectora (Figura 3).



**Figura 3.-** Las células T cooperadoras (linfocitos T CD4<sup>+</sup>) pueden separarse en 2 tipos dependiendo de las citocinas que secretan. Aún cuando ambas respuestas son reacciones inflamatorias, las reacciones producidas por las células Th1 se caracterizan por ser de inmunidad protectora contra *M. tuberculosis*, mientras que las generadas por las células Th2 regularmente se caracterizan por ser no protectoras (Schluger, 1998).

Las células CD4<sup>+</sup> Th1 secretan la citocina INF- $\gamma$ , que es una glicoproteína producida en respuesta a infecciones bacterianas, especialmente a organismos intracelulares como las micobacterias, el INF- $\gamma$ , además de ser una citocina pro-inflamatoria, tiene diversas funciones en la defensa del hospedero. En la infección por *M. tuberculosis* es un importante activador de macrófagos, estimulando la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno (Figura 4). Mediante este mecanismo, se inhibe la proliferación de la micobacteria (Schluger, 1998). El INF- $\gamma$  incrementa la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase 2 (MHCII) en macrófagos, lo que ocasiona un incremento en la presentación de antígeno y de esta manera, amplifica la respuesta inmune (Schluger, 2001). Además, el

INF- $\gamma$  regula la expresión y secreción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en los macrófagos.

Por otro lado, las células CD4<sup>+</sup> Th2 tienen efecto inhibitorio en la erradicación de *M. tuberculosis*. La interleucina-10 (IL-10), que es secretada por células Th2, inhibe la producción de interleucina-12 (IL-12) e INF- $\gamma$  (Figura 4). También regula en forma negativa la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHCII), inhibiendo el proceso de presentación de antígeno por los macrófagos (Rojas, 1999; Zhang, 1995).

El papel de las células NK en la respuesta del hospedero no ha sido completamente identificado. Estas células son linfocitos grandes granulares que pueden desarrollar morfología dendrítica en tejidos linfoides, y representan menos del 10% de los linfocitos T circulantes. Actualmente se sabe que estas células desempeñan un papel en la respuesta inmune temprana y pueden tomar parte en el establecimiento en la protección en los pacientes con infección latente (Schluger, 1998).

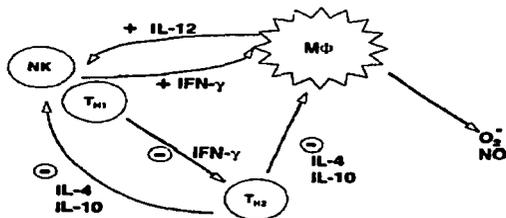


Figura 4.- Vista general de la interacción linfocito-macrófago en la tuberculosis. Linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Th1) y células "Natural Killer" (NK) secretan interferón gamma (INF- $\gamma$ ), activando a los macrófagos alveolares para producir especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno

(RNS), que están involucradas en erradicación y la inhibición de la proliferación de la micobacteria. En una retroalimentación positiva para amplificar esta vía, los macrófagos secretan interleucina-12 (IL-12). Aún cuando la interleucina-4 (IL-4) y la interleucina-10 (IL-10) pueden inhibir la función del macrófago, no existe una evidencia consistente que estas citocinas se presenten en grandes cantidades en los pulmones de los pacientes con tuberculosis, y lo anterior puede ser por una supresión de la función celular de las células Th2 mediada por interferón (Schluger, 1998).

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> también participan en la defensa del hospedero; se ha visto que, además de ser linfocitos citotóxicos, estas células son capaces de producir la citocina INF- $\gamma$  e interleucina-4 (IL-4) y de esta manera, balancear la inmunidad protectora y la no protectora en los pulmones de los pacientes con tuberculosis. Este tipo de células reconocen fragmentos peptídicos de antígeno ya procesado y presentado en moléculas de MHC I. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> reconocen a los macrófagos alveolares y a las células dendríticas, que son células presentadoras de antígeno profesionales (Schluger, 1998; 2001). Al ser citotóxicos, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> causan la lisis de las células blanco infectadas como monocitos y macrófagos, pero también causan la muerte directa de patógenos intracelulares. La actividad microbicida directa esta dada por una proteína llamada granulosa que es secretada por estas células y que puede matar directamente a *M. tuberculosis* extracelulares (Schluger, 2001).

Los macrófagos alveolares son las primeras células de defensa contra las micobacterias que han sobrevivido a las defensas mecánicas del hospedero y llegan a establecerse en las regiones distales de los pulmones. Por lo tanto, los macrófagos son cruciales en la interacción hospedero-parásito. Los macrófagos alveolares son capaces de inhibir el crecimiento del bacilo mediante la fagocitosis, y de participar en el

procesamiento y presentación del antígeno a los linfocitos T (Figura 5) (Schluger, 1998; 2001). Los macrófagos secretan interleucina-12 (IL-12), que regula la diferenciación de los linfocitos TCD4<sup>+</sup> a Th1 ó Th2, favoreciendo al tipo Th1. Esta citocina se libera después de que ocurra la infección de los macrófagos con *M. tuberculosis* y mantiene activa la fagocitosis (Schluger, 1998).

Los macrófagos y monocitos, en respuesta a componentes de la pared celular de *M. tuberculosis* como el peptidoglicano y el lipoarabinomano (LAM), producen TNF- $\alpha$ . El papel principal de esta citocina es mediar la respuesta inflamatoria y activar macrófagos. Al actuar como factor quimiotáctico para monocitos y neutrófilos, participa en la formación de granulomas, inhibiendo la proliferación de la micobacteria (Schluger, 2001; Saunders, 2000).

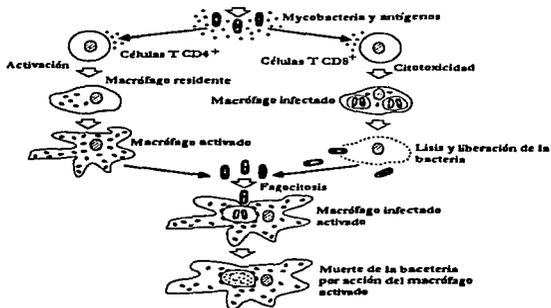


Figura 5.- Los macrófagos activados por los linfocitos CD4<sup>+</sup> pueden erradicar a la bacteria; por otro lado la citotoxicidad, mediada por linfocitos CD8<sup>+</sup>, puede liberar las bacterias intracelulares y permitir el englobamiento y destrucción de las mismas por los macrófagos activados (Medical Microbiology, 1996, Baron).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **FAGOCITOSIS Y RESPUESTA INMUNE INNATA.**

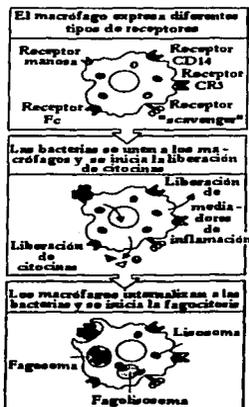
La fagocitosis es la internalización de partículas grandes ( $>0.5\mu\text{m}$ ) mediada por células y que ocurre por mecanismos dependientes de actina e independientes de clatrina. Las funciones principales de la fagocitosis son:

- Limpiar al organismo de restos celulares ó células apoptóticas.
- Defender al organismo de agentes infecciosos atrapándolos (aquí participan los fagocitos).
- Induce a que se lleve a cabo la respuesta inmune, debido a que los macrófagos llevan a cabo el procesamiento y presentación de antígeno (Aderem, 1999; Pieters, 2001).

Las células fagocíticas profesionales son los monocitos, los macrófagos y los neutrófilos polimorfonucleares. Estos leucocitos son mediadores de respuestas inmunes innatas, pues forman una primera línea de defensa a la infección, por que se unen a los microorganismos, los ingieren y los destruyen. La fagocitosis es un proceso regulado por diversos receptores que tienen funciones variables ya que, algunos pueden regular tanto la adhesión como la internalización de las partículas (Aderem, 1999). Muchos de los receptores involucrados son inespecíficos, por lo que pueden unirse a una amplia variedad de productos microbianos (Roitt, 1997). Estos receptores requieren de un mecanismo de transducción de señales, basado en la motilidad de actina para funcionar eficientemente. Este proceso es complejo debido a la diversidad de estímulos que están involucrados y la capacidad de los diversos organismos de influir el mecanismo por el cual serán internalizados en los fagocitos (Aderem, 1999).

Los pasos principales por los que ocurre la fagocitosis son los siguientes (Figura 6):

- 1) Unión de la bacteria con la célula fagocítica (macrófago, etc.). Esta interacción esta mediada por receptores (específicos o inespecíficos) de la superficie del fagocito con ligandos de la superficie de la partícula.
- 2) Internalización de la partícula. Los receptores fagocíticos transducen señales al interior de la célula, que promueven la polimerización de actina necesaria para la invaginación de la membrana plasmática.
- 3) Formación del fagosoma. La internalización total de la partícula produce la formación del fagosoma
- 4) Maduración del fagosoma a fagolisosoma. El fagolisosoma se forma mediante una serie de eventos de fusión y fisión del fagosoma con vesículas citoplasmáticas que contienen enzimas degradativas (Aderem, 1999).



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 6.- Los macrófagos expresan diferentes receptores para bacterias, se presenta la interacción macrófago-bacteria, y comienza la fagocitosis (Janeway, 2001).

## **FAGOCITOSIS DE *M. tuberculosis***

### **Pared celular de *M. tuberculosis***

La peculiar pared celular de *M. tuberculosis* (que le confiere la característica de tinción ácido-alcohol resistente) es reconocida por diversos receptores fagocíticos, por lo que está directamente involucrada en la patogénesis de este microorganismo (Pieters 2001). La composición de la pared celular de *M. tuberculosis* es compleja (figura 7) ya que podemos encontrar:

- Muchas proteínas asociadas con el péptidoglicano (PG), las cuales pueden ser inmunogénicas. El PG se encuentra unido covalentemente por enlaces fosfodiéster al arabinogalactano (AG) un polímero de arabinosa y galactosa.
- Ácidos micólicos, están constituidos de una cadena larga de átomos de carbono (de 60-90) unida con el ácido murámico del peptidoglicano, y con el arabinogalactano por medio de enlaces de esterificación de glicolípidos.
- Dimicolato de trealosa, (conocido como factor cuerda).
- Sulfolípidos, tienen un papel importante en la virulencia ya que están involucrados en la inactivación de los macrófagos.
- Liparabinomano (LAM), que se encuentra como una mezcla heterogénea de arabinosa, manosa y lipopolisacáridos fosforilados de alto peso molecular (17 kDa) (Fenton , 1996; Ainsa, 2001)

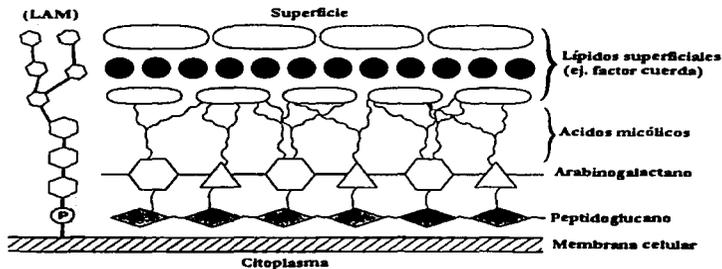


Figura 7.- Composición de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis* (Medical Microbiology, 1996. Baron).

#### Receptores fagocíticos a *M. tuberculosis*.

Los receptores fagocíticos de membrana que median la unión de la micobacteria a fagocitos son los determinantes en la internalización del patógeno (Tabla 1). Entre los receptores fagocíticos importantes para la fagocitosis de *M. tuberculosis* se encuentran:

- Receptores de complemento CR1, CR3 y CR4. Estos receptores, que se expresan en macrófagos, se unen a micobacterias opsonizadas con componentes de complemento, principalmente C3b y sus derivados proteolíticos. C4b actúa también como opsonina aún cuando desempeña un papel menor. CR3 y CR4 también son expresados en células NK y en algunos linfocitos T citotóxicos.
- Receptores de manosa (MR). Estos receptores reconocen polisacáridos presentes en la pared celular de *M. tuberculosis*, principalmente el lipoarabinomano (LAM).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- **Receptores "Toll-like".** Estos receptores actúan como mediadores del englobamiento de la micobacteria en el macrófago ya que a estimula la producción de interleucina-12, así como de TNF- $\alpha$ .
- **Receptor CD14.** Este receptor reconoce lipopolisacárido (LPS), por lo que sirve para que los macrófagos alveolares unan a *M. tuberculosis*.
- **Receptores "scavenger".** Están localizados en la superficie del macrófago y tienen afinidad por una amplia variedad de ligandos como lipoproteínas de baja densidad, polirribonucleótidos, polisacáridos (incluyendo al sulfato de dextrán), fosfolípidos aniónicos y otras moléculas como endotoxinas bacterianas (Pieters, 2001; Schluger, 1998, 2001).

**Tabla 1.-** Receptores involucrados en la fagocitosis de *Mycobacterium tuberculosis*

<b>Receptor en el macrófago</b>	<b>Ligando en <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>
Receptor CR1, CR3, CR4	C3b
Receptor de Manosa	Lipoarabinomanano (LAM)
Receptor CD14	Lipopolisacárido (LPS)
Receptor "Scavenger"	Fosfolípidos aniónicos

## **II.-OBJETIVOS.**

### **Objetivo general:**

- **Compilar información reciente sobre la interacción entre el receptor de complemento tipo 3 (CR3) y la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, y analizar la participación de CR3 en el curso de la enfermedad.**
- **Describir la importancia del receptor de complemento tipo 3 (CR3) en la fagocitosis y supervivencia de *Mycobacterium tuberculosis*.**

### **Objetivos particulares:**

- **Describir las características físicas y moleculares de la tuberculosis.**
- **Describir el mecanismo de entrada *Mycobacterium tuberculosis* a las células del hospedero.**
- **Describir las características estructurales y bioquímicas del receptor de complemento 3 (CR3)**

### **III.-INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL TEMA.**

#### **Características del receptor de complemento tipo 3 (CR3).**

El receptor de complemento tipo 3 (CR3,  $\alpha_M\beta_2$ , CD11b/CD18) es un receptor de adhesión y reconocimiento. Se puede unir tanto a ligandos endógenos (i.e. el componente C3bi de la cascada de complemento) como a moléculas de superficie de algunos microorganismos (i.e. componentes de la pared celular de bacterias). Estas características lo hace un receptor fagocítico primario, por lo que se expresa predominantemente en fagocitos profesionales (macrófagos, monocitos, leucocitos).

CR3 es un receptor heterodimérico perteneciente a la familia de las integrinas. Las integrinas son receptores de superficie involucrados en el reconocimiento célula-célula, en el reconocimiento entre las células y la matriz extracelular (ECM), y pueden unir ligandos solubles, como derivados del complemento. Las integrinas están formadas por 2 cadenas peptídicas transmembranales llamadas alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ). Aún cuando la participación de la cadena  $\alpha$  en la unión a ligando ha sido ampliamente descrita, la especificidad del ligando está determinada en los dominios extracelulares de ambas cadenas peptídicas.

La subunidad  $\alpha$  (figura 8) está formada por una hoja central  $\beta$  paralela rodeada de 7 hojas  $\beta$ -plegadas (cada hoja contiene aproximadamente 60 aminoácidos). La subunidad  $\alpha$  de las integrinas tiene un sitio de unión a ligando conocido como dominio I, donde se encuentra un sitio de unión a cationes divalentes en la región que tiene la secuencia de AspXSerXSer. Esta región se conoce como sitio de adhesión dependiente de iones metálicos (MIDAS) (Arnaout, 2002).

La subunidad  $\beta$  es una proteína transmembrana con un amplio dominio extracelular (de 700-1100 residuos) y de un pequeño dominio citoplasmático (30-50 residuos). En su fracción extracelular contiene secuencias ricas en cisteínas, las cuales se encuentran involucradas en la coordinación con el dominio I. Existe una región que une a la subunidad  $\alpha$  con la subunidad  $\beta$  y se conoce como dominio  $\beta\alpha$ . Esta región constituida de 243 aminoácidos, es altamente hidrofóbica ya que está formada por anillos aromáticos.  $\beta\alpha$  También contiene el sitio de adhesión dependiente de iones metálicos (MIDAS). Se ha demostrado que es en este dominio donde se realiza la unión al ligando (Amaout, 2002, Humpires, 2000, 2002).

CR3 pertenece a la subfamilia de integrinas  $\beta_2$ , la cual contiene cuatro miembros que tienen la cadena beta en común pero están asociados a diferentes subunidades alfa:  $\alpha_M\beta_2$  (CD11b/CD18, Mac-1, CR3),  $\alpha_L\beta_2$  (CD11a/CD18, CR4),  $\alpha_X\beta_2$  (CD11c/CD18) y  $\alpha_D\beta_2$ . Estas integrinas se expresan en células del sistema inmune como en leucocitos polimorfonucleares (PMNs), monocitos, macrófagos y en linfocitos activados en donde esta involucrada la adhesión célula-célula, fagocitosis, quimiotaxis y activación de células, las cuales son las respuestas clave de la inmunidad innata (Agramonte-Hevia, 2002; Ehlers, 2000).

Las cadenas  $\alpha$  de CR3 contienen sitios de unión a cationes divalentes que son importantes en el reconocimiento y unión al ligando. Los cationes principales son el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ); en CR3 se ha encontrado una alta afinidad del sitio de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  (Brown, 1991).

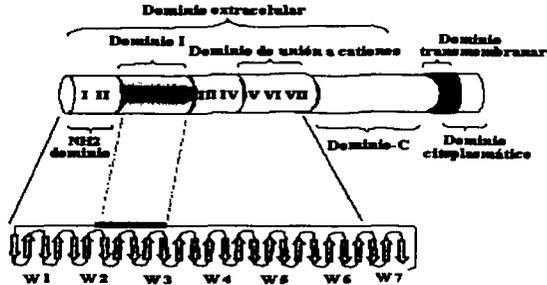


Figura 8.- Estructura de la subunidad  $\alpha$  de las integrinas.

En CR3 un sitio de lectina ha sido identificado, que se une a partículas solubles de  $\beta$ -glucano. La localización exacta del sitio de lectina dentro de la cadena  $\alpha$  (CD11b) no ha sido determinada aun, pero se sabe que se puede ser bloqueado por oligosacáridos de  $\beta$ -glucano que contienen por lo menos siete subunidades de glucosa, lo que sugiere que representa una porción relativamente pequeña del dominio terminal C. El mapeo del sitio de lectina es complicado, debido a la flexibilidad de las integrinas. Se sabe que, la unión de anticuerpos al N-terminal del dominio I, enmascara al C terminal del sitio de lectina (Xia, 2002).

### Ligandos del receptor de complemento tipo 3 (CR3).

Las características estructurales de CR3 le permiten reconocer una gran variedad de ligandos (tabla 2). Entre los ligandos de CR3 se incluyen péptidos como la molécula

de adhesión intracelular (ICAM-1), polisacáridos como el zimosán, y lípidos como el glicofosfatidilinositol (GPI) *bx*.

Tabla 2.- Ligandos de CR3.

Naturaleza del ligando	Ligando	Dominios involucrados	Función
<b>Proteínas</b>			
Matriz extracelular	Fibrinógeno	Dominio I	Adhesión a la matriz celular, migración.
Contrareceptor de la superfamilia de las inmunoglobulinas	ICAM-1, ICAM-2	Dominio I	Adhesión célula-célula.
Proteínas de coagulación	Heparina, Factor X	Dominio I	Adhesión a la matriz celular, transmigración, e iniciación de la cascada de coagulación asociada a monocitos.
Productos de la vía de complemento	C3bi	Dominio I	Fagocitosis, activación celular, citotoxicidad de células NK.
Otros	Cya	—	Fagocitosis de <i>B. pertussis</i>
	NIF	Dominio I	Inhibición de la migración de neutrófilos
	FHA	Dominio I	Fagocitosis
	HMW	—	Factor de virulencia de <i>Haemophilus influenzae</i>
<b>No- proteicos</b>			
	LPS	Dominio de lectina	
	Zimosán(β-glucano)	Dominio de lectina	Fagocitosis y activación celular

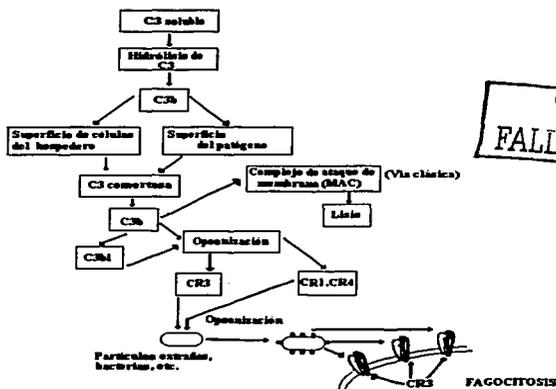
### **Funciones del receptor de complemento tipo 3 (CR3).**

La familia de integrinas  $\beta 2$  participa en la fagocitosis y funciones del estallido respiratorio, así como en la adhesión y quimiotaxis (Brown, 1991). La activación de CR3 induce la extravasación de los leucocitos y promueve la migración y activación de monocitos (Agramonte-Hevia, 2002).

La función mejor descrita de CR3 es su participación en la fagocitosis de bacterias opsonizadas con el fragmento C3bi, generado en la cascada del complemento. Las dos vías principales de activación del complemento reflejan las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. La vía clásica conecta el sistema del complemento con el sistema inmunitario adaptativo, mientras que la vía alterna es parte del sistema inmunitario innato. La generación de C3bi requiere, como primer paso, que C3 sea hidrolizado (por una C3 convertasa) a C3b. C3b posee un grupo tioester reactivo que puede unirse covalentemente a la superficie de células extrañas y propias. El factor clave en la discriminación entre lo propio y lo ajeno por parte del complemento es la unión rápida y masiva de C3b a las estructuras extrañas, como los microorganismos, mientras que las superficies de huésped quedan protegidas por moléculas de membrana que impiden que se deposite eficientemente C3b. Una vez unido a la membrana de microorganismos, C3b es hidrolizado por una proteasa (llamada factor I, que utiliza como cofactor CR1 o al factor H), dando lugar a C3bi (que permanece unido) y a C3f (soluble) (Roitt, 1997). La figura 9 esquematiza los cambios que sufre C3 para formar C3bi y la función en la fagocitosis de los fragmentos generados. C3b y C3bi actúan como opsoninas y promueven la fagocitosis del microorganismo mediante su interacción con los receptores de complemento, entre los que se encuentra CR3 (ver tabla 3).

**Tabla 3.-Receptores de los fragmento del componente C3 del complemento.**

RECEPTOR	LIGANDOS	DISTRIBUCIÓN CELULAR
<b>CR1 (CD35)</b>	C3b > iC3b C4b	Células B, neutrófilos, monocitos, macrófagos, eritrocitos, células dendríticas
<b>CR2 (CD21)</b>	iC3b, C3dg, virus de Epstein- Barr, interferón $\gamma$	Células B, células dendríticas, células epiteliales
<b>CR3 (CD11b/CD11c)</b>	iC3b, zimosán, algunas bacterias, fibrinógeno, factor X, ICAM-1	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK, células dendríticas
<b>CR4 (p150-95) (CD11b/CD11c)</b>	iC3b, Fibrinógeno	Neutrófilos, monocitos, macrófagos.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

**Figura 9.- Cambios que sufre C3 para formar C3bi y la función en la fagocitosis de los fragmentos generados. C3b y C3bi actúan como opsoninas y promueven la fagocitosis del microorganismo mediante su interacción con los receptores de complemento, entre los que se encuentra CR3.**

Sin embargo, a través del dominio de lectina, CR3 puede reconocer carbohidratos de la superficie bacteriana para que los fagocitos ingieran bacterias sin opsonizar. Además, CR3 es capaz de interactuar físicamente con otros receptores expresados en la membrana de la célula fagocítica, como el receptor a LPS (CD14), el receptor tipo 3B para la fracción Fc de IgG (FCγRIIIB) y el receptor a plasminógeno activado por uroquinasa (uPAR). En estas asociaciones, CR3 proporciona una maquinaria de transducción de señales al reconocimiento ligando-receptor. De esta manera CR3 también participa en la fagocitosis de bacterias opsonizadas con LPS, IgG o plasminógeno (Agramonte-Hevia, 2002).

La fagocitosis de bacterias patógenas como *B. pertussis*, *S. typhi* y *E. coli*, regulada por CR3 es efectiva, pero probablemente no es suficiente para inducir la erradicación de las mismas. Como ya se mencionó, el destino del patógeno es determinado por una combinación de factores del hospedero y del agente infeccioso.

#### **Transducción de señales mediada por el receptor de complemento tipo 3 (CR3).**

Como consecuencia del reconocimiento ligando- receptor, CR3 se agrega en complejos multimoleculares que activan diferentes vías de señalización que promueven rearrreglos en el citoesqueleto, transcripción genética y la liberación de intermediarios reactivos de oxígeno (ROIs), con la finalidad de promover de forma efectiva la fagocitosis y la erradicación de las bacterias. El primer paso de la señalización mediada por CR3 involucra la formación de complejos de señalización multiprotéicos, que incluyen cinasas de tirosina, proteínas de citoesqueleto y proteínas adaptadoras. Todas las vías de transducción de señales promovidas por CR3 son dependientes de cinasas de

tirosina intracelulares; Syk y la familia Src (p58<sup>Fgr</sup>, p59/61<sup>Lyn</sup>) son iniciadores clave en la respuesta celular. Estas cinasas de tirosina fosforilan proteínas asociadas al citoesqueleto como la  $\alpha$ -actina, paxilina y talina, regulando los rearrreglos del citoesqueleto. La activación de cinasas de tirosina también induce la activación de las vías de fosfolipasa C (PLC) y de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K). PLC promueve la liberación de calcio de reservorios intracelulares y su flujo a partir del medio extracelular; estos eventos activan a las proteínas que cortan microfilamentos de actina (pues son dependientes de calcio) y como consecuencia inducen la reorganización del citoesqueleto. La estimulación de PI3K induce la activación de fosfolipasa D (un regulador importante de el englobamiento de partículas y de la generación de ROIs) y la estimulación de las GTPasas de bajo peso molecular Rho y Rac, fuertemente implicadas en la regulación del citoesqueleto. Adicionalmente las cinasas de tirosina activadas por CR3 pueden encender las vías de señalización Ras/Erk, probablemente por la formación del complejo Shc-Grb2-Sos. A través de esta vía, CR3 puede activar la transcripción genética, y promover la activación celular (Agramonte-Hevia, 2002).

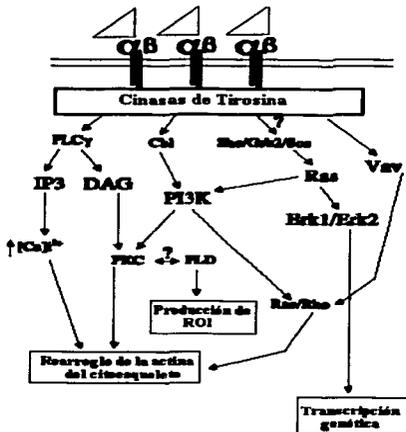


Figura 10.- Vías de señalización de CR3. (los triángulos representan a los ligandos)  
(Agramonte-Ilevia, 2002).

***M. tuberculosis* opsonizada con complemento se une al receptor de complemento 3 (CR3).**

La fagocitosis de *M. tuberculosis* opsonizada por complemento desempeña un papel importante en la patogénesis de la tuberculosis porque afecta la fusión fagosoma-lisosoma y permite la supervivencia de la bacteria. *M. tuberculosis* puede ser opsonizada con C3b y C3bi por la activación de la vía alterna del complemento (Schlesinger, 1990). Mas adelante, la bacteria por sí misma puede producir opsoninas

derivadas de complemento, a través de componentes de la pared celular que están asociadas con los fragmentos de complemento C2 para formar una C3 convertasa (Schlesinger, 1998). Una vez opsonizada, *M. tuberculosis* puede ser fagocitada a través de la interacción con receptores de complemento CR1, CR3 y CR4 (Schlesinger, 1990), a pesar de que experimentos *in vitro* muestran que CR3 media aproximadamente el 80% de la ingestión de *M. tuberculosis* opsonizadas con complemento (Schlesinger, 1990). Esto indica que CR3 es el principal receptor de complemento involucrado en la fagocitosis de la micobacteria.

La unión de C3bi a CR3 activa vías de señalización que promueven la reorganización del citoesqueleto, transcripción genética y la liberación de intermediarios reactivos de oxígeno, que promueven la fagocitosis y la eliminación de bacterias. Sin embargo, la transducción de señales que produce CR3 después de que se une a la micobacterias opsonizadas aún no se conocen totalmente. La señalización de CR3 necesita de la activación de las cinasas de tirosina, Fgr, Hck, Lyn (miembros de la familia Src), que fosforilan proteínas asociadas al citoesqueleto como  $\alpha$ -actina, paxilina y talina (Gatfield, 2000), regulando los rearrreglos del citoesqueleto (Dib, 2000). La activación de cinasas de tirosina por CR3 induce la fosforilación de la isoforma 2 de fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), la cual promueve la liberación de calcio de depósitos intracelulares (Berton, 1994), y su flujo a partir del medio extracelular (Hellberg, 1996). El incremento global de las concentraciones de calcio en el citosol activa a proteínas que cortan los microfilamentos de actina y como consecuencia, inducen la reorganización del citoesqueleto (Pettit, 1996). En la fagocitosis de *M. tuberculosis* mediada por CR3 hay descritas alteraciones en las vías de señalización. En macrófagos derivados de monocitos (MDM), las partículas opsonizadas con complemento inducen un incremento en el calcio citosólico que es dependiente de la subunidad  $\beta$  de CR3

(CD18) (Hendey, 1992). Por el contrario, *M. tuberculosis* opsonizada con complemento falla al inducir incrementos en el calcio y como consecuencia se disminuye la eficiencia de la activación de calmodulina y de la cinasa de miosina II (CaMKII) dependiente de calmodulina (Malik, 2000), esto se relaciona con la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma y con un incremento en la supervivencia de *M. tuberculosis*. Se ha observado que *M. avium*, otra micobacteria patógena, también afecta la actina del citoesqueleto en macrófagos (Malik, 2001), produciendo posiblemente alteraciones similares.

La entrada opsonica de *M. tuberculosis* a los macrófagos promueve la activación de fosfolipasa D (PLD). PLD regula (junto con las GTPasas de bajo peso molecular miembros de la subfamilia Rho) la reorganización de la actina del citoesqueleto, dirigiendo el englobamiento de la bacteria (Guérin, 2000) y la fusión fagosoma-lisosoma (Malik, 2001). La unión de *M. tuberculosis* opsonizada con complemento de las cepas Ederman o H37Ra a los macrófagos incrementa la fosforilación en tirosinas de múltiples proteínas del macrófago, que inducen la activación de PLD (Iyer, 1999). Esta activación incrementa la cantidad fagocitadas de ambas cepas (Iyer, 1999). Dado que la fagocitosis de *M. tuberculosis* regulada por CR3 no activa la fusión de fagosomas con lisosomas, se sugiere que *M. tuberculosis* toma ventaja de algunas funciones de PLD pero bloquea otras. La precisa participación de PLD en la supervivencia de *M. tuberculosis* aún no ha sido determinada.

Las alteraciones en la movilización de calcio y en la activación de PLD durante la ingestión de *M. tuberculosis* mediada por CR3 contribuyen a su supervivencia dentro de los macrófagos, pero aún no es claro si estas alteraciones son producidas por la unión de *M. tuberculosis* a CR3 o si son producidas por la activación / inactivación de otros receptores. Recientemente se ha demostrado que CR3 provoca diferentes vías de señalización induciendo en neutrófilos apoptosis (Kusner, 1996). En este contexto, es

posible que la fagocitosis opsónica de *M. tuberculosis* regulada por CR3 genere diferentes señales a las que normalmente son inducidas por CR3.

Los datos disponibles sugieren que la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma producida por *M. tuberculosis* no es activamente controlada por la unión a CR3, pero si por moléculas solubles de la micobacteria. Un ejemplo de moléculas secretadas por *M. tuberculosis* es una lipoproteína de 19 KDa, que activa al receptor "Toll-like" 2 (TLR-2) en macrófagos, alterando la expresión genética (Whitlock, 2000). En neutrófilos humanos, la fusión fagosoma-lisosoma es bloqueada por la liberación de factores al citosol de los fagocitos, demostrando que el proceso fagocítico es independiente de la fusión fagosoma-lisosoma (Noss, 2001). En conclusión, las vías de señalización activadas por CR3 que son promovidas por las micobacterias cubiertas con C3bi son diferentes de aquellas que son inducidas por otras bacterias pero, aún cuando regula una gran proporción de la fagocitosis de *M. tuberculosis*, CR3 no tiene influencia en la supervivencia de la micobacteria.

### **El Receptor de Complemento 3 media la fagocitosis no opsónica de *M. tuberculosis*.**

Es generalmente aceptado que la unión no opsónica entre la micobacteria y los fagocitos mononucleares es importante en la infección primaria por la inhalación de la bacteria, porque los componentes de complemento pueden estar limitados en el espacio alveolar. Los fagocitos que ingieren directamente las micobacterias inhaladas pueden ser los vectores que ayudan a la micobacteria a traspasar las barreras epiteliales pulmonares. Como se mencionó anteriormente, la unión no opsónica regulada por CR3 se da en un sitio diferente al sitio de unión a C3bi (Peyron, 2000); esta segunda región

de unión ha sido identificada como el dominio de lectina, localizado en la región C del dominio I de la subunidad  $\alpha$  (CD11b) (Cywes, 1996). El dominio de lectina regula la fagocitosis de partículas que contienen  $\beta$ -glucano como el zimosán (Cywes, 1997) pero también puede interactuar con la manosa, N-acetil-D-glucosamina (NADG) y glucosa (Thornton, 1996). *M. tuberculosis* presenta una amplia variedad de carbohidratos en su superficie (Ehlers, 1998), pero la composición precisa de la pared celular varía de una cepa a otra. Cambios en la composición de carbohidratos modifican la capacidad de *M. tuberculosis* para unirse a CR3. Por ejemplo, la cepa de *M. tuberculosis*-H37Rv, que tiene una expresión incrementada de glucosa y arabinosa, esto presenta una unión incrementada a células CHO transfectadas con CR3 y a MDM (Cywes, 1997). Este incremento en la unión puede ser prevenido si la micobacteria es preincubada con amiloglucosidasas, o si el dominio de lectina es bloqueado con una mezcla de D-glucano y D-manano capsular (Cywes, 1996). De forma similar,  $\beta$ -1,3-D-glucano reduce en un 50% el englobamiento de *M. tuberculosis* por macrófagos murinos (Ross, 1985). Adicionalmente se ha encontrada que cuatro de cinco *M. tuberculosis* aislados de pacientes con tuberculosis se une al dominio de lectina de CR3 (Cywes, 1996). Estos datos indican que, *M. tuberculosis* sin ser opsonizada puede usar a CR3 para entrar a los macrófagos. Esta fagocitosis no opsonizada mediada por CR3 también ocurre con otras especies patógenas de micobacteria.

Como ocurre con la fagocitosis opsonizada, la fagocitosis no opsonizada no induce la erradicación de la bacteria. En células U937, la fagocitosis no opsonizada de *M. tuberculosis* inhibe la producción de aniones superóxido, mientras que la ingestión de zimosán la induce (Hetland, 2002). Esto parece indicar que, aunque los carbohidratos de la micobacteria y el zimosán se unan al mismo dominio de CR3, pueden producir diferentes respuestas. Esto se puede explicar porque, en la fagocitosis de zimosán otros

receptores participan, específicamente, se ha demostrado que el receptor de manosa y el receptor delectina-1 (un receptor para  $\beta$ -glucano recientemente descubierto) participan en la fagocitosis de zimosán (Tuckwell, 1992; Speert, 1985). La participación individual de cada uno de estos receptores en la producción de superóxido inducida por zimosán necesita ser aclarada. Aun así, no se puede descartar la posibilidad de que el dominio de lectina de CR3 tenga dos diferentes subsitios de unión que promueven diferentes respuestas.

A diferencia de macrófagos, las alteraciones producidas por la micobacteria en neutrófilos son diferentes. La entrada no opsonizada de la micobacteria (ya sea patógena o no patógena) provoca el estallido respiratorio y la liberación de proteínas granulares específicas, pero la fusión de los lisosomas con los fagosomas no es completa (Brown, 2001). La fagocitosis no opsonizada de *M. kansasii* que realizan los neutrófilos, requiere de la asociación en microdominios ricos en colesterol, de CR3 con las proteínas CD16 y CD14 (ancladas a GPI) (Noss, 2001). Bajo estas condiciones, la micobacteria es internalizada en los fagosomas cubierta por la proteína TACO, y esto previene la degradación de la micobacteria en los lisosomas (N'Diaye, 1998). CR3 regula la fagocitosis no opsonizada de *M. smegmatis* (Gatfield, 2000), a pesar que únicamente agregados de tres a 5 bacterias de *M. smegmatis* inducen la fusión de fagosomas con lisosomas (Gatfield, 2000). Esto indica que la eficiente formación del fagolisosoma requiere la participación de diversos receptores fagocíticos, y de la reorganización de la actina (Cougoule, 2002). Cuando los receptores involucrados están anclados en la membrana a glicofosfatidilinositol (GPI) (CD16), estos pueden producir cambios conformacionales en CR3 y como consecuencia, aumentar la afinidad de CR3 a las moléculas de micobacteria.

Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, aunque la entrada de la micobacteria regulada por CR3 está aumentada, esto no implica un aumento en la supervivencia de la micobacteria.

La participación y activación de receptores adicionales puede ser inducido por agregados de micobacterias en consecuencia, se genera una señalización adecuada para la formación del fagolisosoma. Se piensa que, en el caso de micobacterias unicelulares, el reclutamiento de algunos receptores puede ser bloqueado por los factores de virulencia de los patógenos. Esta hipótesis esta basada en el hecho que, el lipoarabinomanano (LAM) (libre de células) es capaz de integrarse a la membrana del macrófago, a través de su región de fosfatidil inositol (Greenberg, 1999). Adicionalmente, PI soluble inhibe la unión y el englobamiento de *M. tuberculosis* en los macrófagos (Ingunaran, 1995), indicando que lipoglucanos o fosfolípidos pueden regular el reconocimiento de la micobacteria por algunos receptores. La cooperación de CR3 con otros receptores puede ser importante para el reconocimiento y la entrada de la micobacteria y puede participar en el control de la fusión fagosoma-lisosoma.

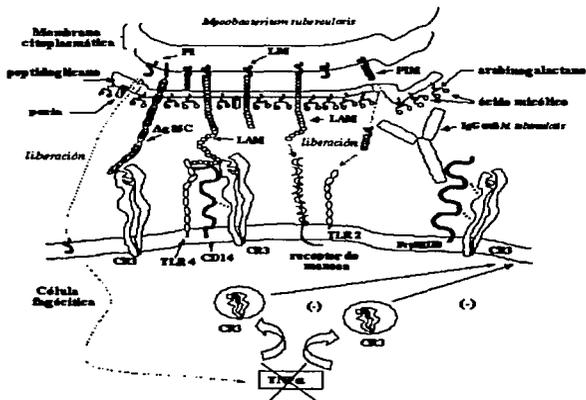


Figura 11.- Esquemática la representación de las posibles interacciones de *M. tuberculosis* con las células fagocíticas (también se esquematiza la interacción CR3- *M. tuberculosis*).

### Participación de CR3 en la infección *in vivo*.

La importancia de la unión *in vivo* regulada por CR3 no ha sido esclarecida porque la participación relativa de cada tipo de fagocitosis mediada por CR3 en una infección *in vivo* es difícil de establecer. Utilizando macrófagos residentes de ratones knockout CD11b, ha sido estimado que CR3 regula aproximadamente 50% de las uniones no opsónicas y 60% de las uniones opsónicas de *M. tuberculosis* (Lien, 2002).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Sin embargo, la proliferación intracelular de *M. tuberculosis* no se afecta cuando son fagocitados por macrófagos que tienen bloqueado CR3 por anticuerpos.

Sin embargo, cuando ratones knockout CD11b fueron infectados con *M. tuberculosis*, el nivel de tejido infectado y el tiempo de muerte no fue diferente al de los ratones del grupo control (Lien, 2002; Zimmerli, 1996). Todos estos datos indican que, en ausencia de CR3, la infección de los fagocitos puede ser soportada por otros receptores. Esto indica que, CR3 regula en gran manera la unión de *M. tuberculosis*, pero no es esencial para la fagocitosis o la supervivencia de *M. tuberculosis*.

#### **IV.-CONCLUSIONES**

La invasión de macrófagos por *M. tuberculosis* es crítica en el establecimiento de la tuberculosis. Los múltiples sitios de unión de CR3 le permiten mediar la fagocitosis opsónica y la no opsónica de *M. tuberculosis*. Evidencias *in vitro* sugieren que CR3 regula, en gran proporción, la unión y fagocitosis de *M. tuberculosis*, pero las vías de señalización normales de CR3 se encuentran alteradas. Aún cuando CR3 regula la entrada de *M. tuberculosis* (esté opsionizada o no) parece que no existe relación con el mecanismo que permite la supervivencia y proliferación de forma intracelular de la bacteria. En el caso de la fagocitosis opsónica de *M. tuberculosis*, la formación de los fagolisosomas es independiente de la entrada. Esto indica que CR3 provee de un mecanismo de entrada a los fagocitos para *M. tuberculosis*, pero las alteraciones a las vías de señalización de CR3 no están relacionadas con los eventos de unión. Por el contrario, la infección efectiva de *M. tuberculosis* necesita de la producción de señales adicionales por la bacteria para controlar el comportamiento de los fagosomas. Estas señales moleculares, comienzan a ser identificadas y pueden ser blancos farmacológicos para el desarrollo de terapias contra la tuberculosis.

En ausencia de complemento, CR3 es uno de los reguladores clave de la unión y de la entrada de *M. tuberculosis* a los fagocitos, dado que el bloqueo del dominio de lectina de CR3 produce inhibición de la fagocitosis. Aún así la fagocitosis no opsónica de *M. tuberculosis* no es totalmente controlada por CR3, sino que requiere de la cooperación de otros receptores como CD14.

La cooperación de CR3 con otros receptores parece ser importante para el reconocimiento y la entrada de la micobacteria y puede participar en el control de la fusión de los fagosomas con los lisosomas. En experimentos *in vivo* en ratones

knockout CD11b indican que CR3 no es esencial para la fagocitosis o la supervivencia de *M. tuberculosis*. Estas evidencias concuerdan con los resultados *in vitro* que sugieren la participación de otros receptores en la infección de los fagocitos. Basados en esto, podemos concluir que CR3 regula de forma importante la unión de *M. tuberculosis*, pero aparentemente no tiene participación en la supervivencia o proliferación de la micobacteria. Todos los datos presentados respaldan la idea de que la capacidad de unión a CR3 no puede ser considerada como un factor de virulencia de la micobacteria patógena.

## V. - BIBLIOGRAFÍA

1. Aderem A, Underhill D. Mechanisms of phagocytosis in macrophages, *Annu Rev Immunol*, 1999; 17:593-623.
2. Aínsa J, Martín C, Gicquel B. Molecular approaches to tuberculosis, *Mol Microbiol*, 2001; 42(2): 561-570.
3. Agramonte-Hevia J, González-Arenas A, Barrera D, Velasco-Velázquez M, Gram-negative bacteria and phagocytic cell interaction mediated by complement receptor 3, *FEMS Immunol Med Mic*, 2002 ; 34:255-266.
4. Arnaout M, Integrins structure: new twist and turns in dynamic cell adhesion, *Immunol Rev*, 2002, 186:125-140.
5. Baron S, *Medical Microbiology*, 4<sup>th</sup> edition, University of Texas Medical Branch, 1996.
6. Berton, G, Fumagalli L, Laudanna C, Sorio C. Beta 2 integrin-dependent protein tyrosine phosphorylation and activation of the FGR protein tyrosine kinase in human neutrophils, *J Cell Biol*, 1994; 126: 1111-1121.
7. Brown E. Complement receptors and phagocytosis, *Curr Opin Immunol*, 1991, 3:76-82.
8. Brown, GD, Gordon S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans, *Nature*, 2001; 413: 36-37.
9. Cougoule, C, Constant P, Etienne G, Daffé M., Maridonneau-Parini I. Lack of fusion of azurophil granules with phagosomes during phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis* by human neutrophils is not actively controlled by the bacterium, *Infect Immunol*, 2002; 70: 1591-1598.
10. Cywes, C, Hoppe HC, Daffé M, Ehlers MRW. Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to human complement receptor type 3 expressed in Chinese Hamster Ovary cells, *Infect Immunol*, 1996; 64: 5373-5383.
11. Cywes, C, Godenir NL, Hoppe HC, Scholle RR, Steyn LM, Kirsch RK, Ehlers MRW. Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement

- receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infect Immunol*, 1997; 65: 4258-4266.
12. Dib K. Beta 2 integrin signaling in leukocytes, *Front Bioscience*, 2000; 5: D438-D451.
  13. Ehlers M, Daffé M. Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: are mycobacterial sugars the key?, *Trends Microbiol*, 1998, 6: 328-335.
  14. Ehlers M. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity, *Microbes Infect*, 2000, 2:289-294.
  15. Ernst J. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*, *Infect Immun*, 1998, 66:1277-1281.
  16. Fenton M, Vermeulen M. Immunopathology of tuberculosis: Roles of macrophages and monocytes, *Infect Immunol*, 1996, 64:683-690.
  17. Fraser R, Sinopsis de enfermedades del tórax, 2a edición, 1996, España.
  18. Galfield, J, Pieters J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*, 2000; 288: 1647-1650.
  19. Greenberg, S. Modular components of phagocytosis, *J Leukocyte Biol*, 1999; 66: 712- 717.
  20. Greenberg S. Diversity in phagocytic signaling, *J Cell Sci*, 2001, 114:1039-1040.
  21. Guérin, I, de Chastellier C. Pathogenic Mycobacteria disrupt the macrophage actin filament network. *Infect Immunology*, 2000; 68: 2655-2662.
  22. Hellberg, CL, Molony L, Zheng L, Andersson TCa<sup>2+</sup> signaling mechanisms of the  $\beta$ 2 integrin neutrophils: involvement of phospholipase C gamma 2 and Ins (1,4,5) P<sub>3</sub>. *Biochem J*, 1996; 317: 403-409.
  23. Hendej, B, Klee CB, Maxfield FR. Inhibition of neutrophil chemokinesis on vitronectin by inhibitors of calcineurin. *Science*, 1992; 258: 296-299.
  24. Hetland G, Sandven P. Beta-1, 3-Glucan reduces growth of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophage cultures. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2002; 33: 41-45.

25. Humpires M. Integrin cell adhesion receptors and the concept of agonism, *Biochem Soc*, 2002 2: 30-32.
26. Humpires M, Integrin Structure, *Trends Pharmacol Sci*, 2000, 311-338.
27. Ilangumaran S, Arni S, Poincelet M, Theler JM, Brennan PJ, Nasir-ud-Din Hoessli, DC. Integration of mycobacterial lipoarabinomannans into glycosylphosphatidylinositol - rich domains of lymphomonocytic cell plasma membranes. *J Immunol*, 1995; 155: 1334-42.
28. Iyer, SS, Kusner DJ. Association of Phospholipase D activity with the detergent-insoluble cytoskeleton of U937 promonocytic leukocytes. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 2350-2359.
29. Janeway C. *Immunobiology*, 5<sup>th</sup> edition, Garland Publishing, New York, 2001.
30. Kusner, DJ, Hall CF, Schlesinger LS. Activation of Phospholipase D is tightly coupled to the phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* or opsonized zymosan by human macrophages. *J Exp Med*, 1996; 184: 585-595.
31. Lien, E, Ingalls RR. Toll-like receptors. *Crit Care Med*, 2002; 30: S1-11.
32. Malik, ZA, Denning GM, Kusner DJ. Inhibition of Ca<sup>2+</sup> signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *J Exp Med*, 2000; 191: 287-302.
33. Malik, ZA, Iyer SS, Kusner DJ. *Mycobacterium tuberculosis* phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages. *J Immunol* 2001, 166: 3392-3401.
34. Melo, MD, Catchpole IR, Haggar G, Stokes RW. Utilization of CD11b knockout mice to characterize the role of complement receptor 3 (CR3,

- CD11b/CD18) in the growth of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages. *Cell Immunol*, 2000; 205: 13-23.
35. N'Diaye, EN, Darzacq X., Astarie-Dequeker C, Daffè M, Calafat J, Maridonneau-Parini I. Fusion of azurophil granules with phagosomes and activation of the tyrosine kinase Hck are specifically inhibited during phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils. *J Immunol*, 1998; 161: 4983-4991.
36. Noss, EH, Pai RK, Sellati TJ, Radolf JD, Belisle J, Golenbock DT, Boom WH, Harding CV. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 2001; 167: 910-918.
37. Peyron P, Bordier C, N'Diaye EN, Maridonneau-Parini I. Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored. *J Immunol*, 2000; 165: 5186-5191.
38. Pieters J. Entry and survival of pathogenic micobacteria in macrophages. *Microbes Infect*, 2001, 3:249-255.
39. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Inmunología*, 4a edición, 1997, España.
40. Rojas R, Balaji K, Dubramanian, Boom H. Regulation of Human CD4<sup>+</sup> αβ T-cell-receptor-positive (TCR<sup>+</sup>) and γδ TCR<sup>+</sup>T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* by interleukin-10 y transforming growth factor β, *Infect Immun*, 1999, 67(12):6461-6472.
41. Ross, GD, Cain JA, Lachman PJ. Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin and functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. *J Immunol*, 1985; 134: 3307-3314.

42. Saunders B, Cooper A. Restraining micobacteria: Role of granulomas in mycobacterial infections, *Immunol Cell Biol*, 2000, 78:334-341.
43. Schlesinger, LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component. *J. Immunol*, 1990; 144: 2771-2780.
44. Schlesinger LS. *Mycobacterium tuberculosis* and the complement system. *Trends Microbiol*, 1998; 6: 47-49.
45. Schluger N, Rom W, The host immune response to tuberculosis, *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157:679-691.
46. Schluger N. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis, *Respir Res*, 2001, 2:157-163.
47. Schorey J, Carroll M, Brown E. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria, *Science*, 1997, 277: 1091-1093.
48. Speert, DP, Silverstein SC. Phagocytosis of unopsonized zymosan by human monocyte derived macrophages: maturation and inhibition by mannan. *J Leukoc Biol*, 1985; 38: 655-658.
49. Thornton, BP, Vetvicka V, Pitman M, Goldman RC, Ross GD. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J Immunol*, 1996; 156: 1235-1246.
50. Tuckwell, DS, Brass A, Humphries MJ. Homology modelling of integrin EF-hands. Evidence for widespread use of a conserved cation-binding site. *Biochem J*, 1992; 285: 325-31.
51. Whitlock, B, Gardai S, Fardok V, Bratton D, Henson PM. Differential roles of alphaM/beta2 integrin clustering or activation in the control of apoptosis via regulation of Akt and Erk survival mechanism. *J Cell Biol*, 2000; 151: 1305-1320.

52. Xia J, Borland G, Huang J, Mizukami F, Petty H, Tood III R, Ross G. Function of the lectin domain of Mac-1/complement receptor type 3 (CD11b/CD18) in regulating neutrophil adhesion. *J Immunology*, 2002, 1169(11) 6417-26.
53. Zhang M, Lin Y, Iyer D, Gong J, Abrams J, Barnes P, T-Cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 1995, 63:3231-3234.
54. Zimmerli, S, Edwards S, Ernst JD. Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996; 15: 760-770.