



La inhibición de la expresión de los antígenos clase I y clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad en macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv se debe a alteraciones en la vía JAK-STAT

Edwin Patiño M.Sc. *, Gloria Vásquez MD. *,
Mauricio Rojas Ph.D. *, Luis F. Garcia MD. *,
Luis F. Barrera Ph.D. *

Resumen

Objetivo: establecer los mecanismos moleculares por los cuales la infección de macrófagos murinos con *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), inhiben la expresión de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) inducidos por Interferón gamma ($IFN\gamma$). **Diseño:** experimental. **Materiales y Métodos:** la línea celular de macrófagos murinos B10R se infectó con *Mtb* cepa H37Rv, o se trató con micobacterias muertas por calor, paredes celulares de *M. bovis* y lipoarabinomano manosilado (ManLAM) **Mediciones:** mediante citometría de flujo y Northern-Blot se evaluó la expresión superficial y los niveles de mRNA para los antígenos del MHC. La expresión superficial de las cadenas α y β del receptor de $IFN\gamma$ ($IFN\gamma R$), se evaluó por citometría de flujo. La evaluación de los niveles de fosforilación de JAK2 y STAT1 se realizó por inmunoprecipitación e inmunodetección. Para la estimación

de los niveles del mRNA para CIITA se utilizó la técnica de RT-PCR. **Resultados:** La infección con *Mtb* resultó en una inhibición de la expresión superficial de los antígenos clase I y II, y de los niveles de mRNA para clase II. Micobacterias muertas por calor y paredes celulares micobacterianas también causaron esta inhibición, pero no el tratamiento con ManLAM. La infección también causó una disminución en la fosforilación de JAK2 y STAT1, pero no una disminución en la expresión superficial del $IFN\gamma R$. Adicionalmente, los niveles de mRNA para CIITA también fueron inhibidos. **Conclusión:** La capacidad de la *Mtb* para evadir la respuesta inmune puede deberse a su habilidad para alterar la respuesta al $IFN\gamma$, y la supresión de las moléculas clase II. **Palabras clave:** Antígenos del MHC, *M tuberculosis*, macrófagos, vía JAK-STAT. **b**

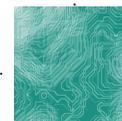
Infectio 2001; 5 (3): 145-156

* Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Este trabajo se financió con el proyecto de Colciencias-Universidad de Antioquia contrato número 215-96. Parte de este trabajo fue realizado por E. Patiño como participante del programa de Jóvenes Investigadores de Colciencias.

Trabajo ganador del Segundo Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Oriente Antioqueño, junio de 2000

Correspondencia: Luis F. Barrera, Laboratorio Central de Investigaciones, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. AA 1226 Medellín, Colombia



Introducción

Una de las estrategias más importantes desarrollada por múltiples microorganismos, para sobrevivir en la célula hospedera, incluyendo virus, bacterias, y protozoos, es la inhibición de la expresión de las moléculas del MHC (1-6).

Recientemente se ha reportado que la infección *in vitro* de macrófagos de origen murino o humano con micobacterias resulta en una inhibición de la expresión, inducida por IFN γ , de los antígenos del MHC (7-10). Entre los mecanismos descritos se ha reportado la inhibición de la expresión del IFN γ R, y la subsecuente disminución en la fosforilación de las proteína tirosina quinasas de la familia Janus JAK1 y JAK2, y del factor de transcripción STAT1, en macrófagos murinos infectados con *M. avium* (10). Utilizando macrófagos de origen humano infectados con *Mtb*, varios mecanismos se han reportado. En el primero de ellos, la inhibición de la expresión de las moléculas clase II se correlacionó con la interferencia de los mecanismos de transporte de estas moléculas, sin disminución de mRNA para clase II y CIITA (11). De otro lado, la inhibición de la respuesta al IFN γ en monocitos infectados con *Mtb* fue atribuida a la reducción de la asociación, inducida por IFN γ , de STAT1 con su coactivador transcripcional CBP/p300 (12). Sin embargo, en este último caso, no se observaron alteraciones en la vía JAK-STAT, y tampoco se determinó si la infección modulaba los niveles de expresión de los antígenos MHC.

Para tratar de obtener mayor entendimiento sobre los mecanismos moleculares que inhiben la expresión de los antígenos MHC, nosotros hemos utilizado macrófagos murinos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Los resultados obtenidos indican que la expresión superficial, inducida por IFN γ , de los antígenos clase II y I, así como los niveles de mRNA para clase II, son significativamente inhibidos. Resultados similares se obtuvieron en macrófagos tratados con micobacterias muertas por calor y paredes celulares micobacterianas, pero no con ManLAM, uno de los principales componentes de las paredes celulares micobacterianas. Se encontró también que la fosforilación de JAK2 y STAT1 estaba

reducida en los macrófagos infectados. Sin embargo, la expresión en superficie de las cadenas α y β del IFN γ R no se encontraron reducidas. La disminución en los antígenos MHC puede ser entonces una consecuencia de la reducida expresión en el transactivador de clase II.

Materiales y Métodos

Línea celular

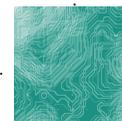
Los experimentos descritos en este artículo se realizaron con la línea de macrófagos B10R, derivada a partir de médula ósea de la cepa de ratones B10A.*Bcg* (13). Las células fueron mantenidas en DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), y 20mM de L-glutamina, en ausencia de antibióticos. Las células se usaron en los experimentos cuando ellas estaban confluentes y con una viabilidad mayor al 90%.

Mtb y derivados de micobacteria

La cepa de *Mtb* H37Rv fue obtenida del Instituto Nacional de Salud (Santafé de Bogotá). Las micobacterias se crecieron hasta el final de la fase logarítmica en medio líquido de Proskauer-Beck (0.5% asparagina, 0.5% monofosfato de potasio, 0.5% sulfato de potasio, 2.0% glicerol) suplementado con 0.5% de Tween 80. Los lotes de *Mtb* fueron alicuotados a una OD₆₀₀ de 0.5 (aprox 3.7x10⁸ CFU/ml) en DMEM conteniendo 30% de glicerol y se mantuvieron a -70°C. Antes de infectar los macrófagos, las micobacterias fueron descongeladas a 4°C, lavadas para remover el glicerol y los cúmulos fueron destruidos mediante una sonicación breve (10s, 2.5 de salida en sonicador Branson).

Para evaluar la eficiencia de la fagocitosis de la micobacteria por la línea B10R, las micobacterias fueron marcadas con acetato de fluoresceína (9), y el porcentaje de las bacterias asociadas a macrófagos fue evaluado por citometría de flujo. El promedio de las células positivas fue de 70% en ausencia y 65% en presencia de IFN γ .

Las micobacterias muertas fueron obtenidas mediante calentamiento a 65°C durante 40 mi-



nutos. Las paredes micobacterianas fueron obtenidas de *Mycobacterium bovis* BCG (Ribi Immunochem Research). El lipoarabinomananosilado (ManLAM) de *M. bovis* fue obtenido de G. Puzo (IPBS, Toulouse, France).

Infección y estimulación de macrófagos

Efecto de la infección con Mtb: 1×10^6 células fueron sembradas en platos de cultivo de seis pozos en 2 ml de medio completo y se les permitió adherirse a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂ durante 4 horas. Posteriormente las células fueron estimuladas con una dosis óptima de IFN γ (100 U/ml) y simultáneamente infectadas con relaciones 1:1, 5:1, 10:1, 20:1 y 50:1 micobacteria: macrófago, o tratadas con relaciones similares de micobacterias muertas por calor. En experimentos separados, las micobacterias fueron tratadas con ManLAM (10 μ g/ml) o con paredes celulares micobacterianas (10 μ g/ml). Para determinar el posible efecto no específico de la fagocitosis en la expresión de superficie de las moléculas MHC, las células fueron cultivadas en presencia de diferentes relaciones (5:1 y 10:1) de partículas fluorescentes e IFN γ . La expresión en superficie fue evaluada 24 horas más tarde mediante citometría de flujo.

Expresión en superficie de las cadena α y β del IFN γ R: las células fueron estimuladas con IFN γ (100 U/ml) y simultáneamente infectadas con micobacterias vivas, utilizando una relación de infección micobacteria: macrófago de 50:1. La expresión en superficie de la cadena α y β fue establecida mediante citometría de flujo 1, 4, 8, y 24 horas después del tratamiento.

Tinción celular y análisis por citometría de flujo Después de la estimulación y/o infección de los macrófagos, el medio de cultivo fue retirado y las células fueron resuspendidas en PBS suplementado con 0.5% BSA y 0.1% de azida de sodio (buffer de lavado). Posteriormente los macrófagos fueron removidos de los pozos e inmediatamente fijadas con 0.5 % de p-formaldehído (pH 7.2) a 4°C durante 15 minutos. Las células fueron lavadas dos veces, durante 1 minuto a 580 x

g utilizando buffer de lavado, los receptor Fc de la IgG II/III (Fc γ RII/III) (antiCD16/CD32) fueron bloqueados con un anticuerpo monoclonal específico por medio de una incubación de 15 minutos a 4°C. Los macrófagos fueron lavados tres veces e incubados durante 30 minutos a 4 °C con anticuerpos específicos para clase II y clase I marcados ya sea con FITC o con R- PE.

La expresión en superficie de las cadenas α y β del IFN γ R fueron estudiadas por métodos indirectos. Brevemente, después del bloqueo Fc γ RII/III y del lavado, las células fueron incubadas durante 30 minutos con anticuerpos policlonales dirigidos contra la cadena α y β del receptor, lavados tres veces y entonces incubados durante 30 minutos a 4°C con el fragmento F(ab)₂ de cabra anti-conejo marcado con FITC.

Todas las tinciones fueron controladas utilizando sus respectivos controles isotípicos. Las células teñidas fueron analizadas utilizando un citómetro de flujo Excalibur (Beckman-Coulter). Los resultados fueron analizados utilizando el software WinMDI 2.8.

Northern-Blot

El RNA total de los macrófagos estimulados con IFN γ y/o infectados con *Mtb* vivas fue obtenido mediante el reactivo Trizol, siguiendo las instrucciones del fabricante. Diez a veinte microgramos del RNA total fueron corridos en una electroforesis en geles de formaldehído-agarosa al 1.2%. Posterior a la transferencia capilar a membranas de Nylon, el RNA fue fijado a la membrana por medio de UV. La membrana fue prehibridada e hibridada en el buffer HybyMax (Ambion), suplementado con 100 μ g/ml de esperma de salmón. Las sondas de IA $_{\alpha}$, IA $_{\beta}$ y GAPDH fueron marcadas utilizando Rediprime (Amersahm) y [³²P]dCTP a una concentración de 1×10^6 cpm/ml de buffer. Para la autoradiografía se utilizaron películas Kodak Biomax.



Transcripción Reversa y amplificación por PCR

Con el fin de estudiar la expresión génica de CIITA, el RNA total fue preparado como se describió arriba. El DNA contaminante fue digerido con la DNAasa RQ1 (Promega). Para la transcripción reversa se utilizó SuperScript II (Gibco, BRL) a 45°C. Para la amplificación de CIITA y GAPDH se utilizó Taq polimerasa (Gibco) y los siguientes primers: CIITA sentido 5'GAAATCAAAGACAAGGAGCTGCC 3', CIITA antisentido 5'ACACAGCTGAGTCCCACGAGG 3'. GAPDH sentido 5' CCCTTCATTGACCTCAACTACATGG 3' y GAPDH antisentido 5' CCATCACTGCCACCCAGAAGACT 3'. La cantidad de cDNA a utilizar se normalizó según amplificación de GAPDH.

Inmunoprecipitación y Western-Blot

Los macrófagos fueron infectados con *Mtb* a una relación de 20:1 micobacteria:macrófago y simultáneamente tratados con IFN γ (100 U/ml); después de 30 minutos de incubación las células fueron lavadas con PBS frío y lisadas con buffer de lisis frío (40 mM tris-HCl pH 8.0, 275 mM NaCl, glicerol 20%, 2% NP40, 1mM PMSF, 20 μ g/ml aprotinina, 20 μ g/ml ortovanadato sodico, 50mM fluoruro de sodio) durante una hora en hielo con agitación suave. El lisado fue posteriormente centrifugado a 15000 x g durante 30 minutos y un total de 500 mg de proteínas, fueron sometidos a inmunoprecipitación con anticuerpo murino antifosfotirosina, como se describe (14). Los inmunocomplejos fueron colectados por incubación con proteína A/G Plus–Agarosa durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, los lisados se corrieron en una electroforesis al 7 % SDS-PAGE y las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas toda la noche a temperatura ambiente con gelatina al 1% en Tris-buffer salino/Tween e incubadas con anticuerpos antifosfotirosina, anti STAT1 o anti JAK2. Para revelar los Western-Blot se utilizó el paquete ECL de quemoluminiscencia, las membranas fueron expuestas posteriormente a las películas (Hyperfilm ECL, Amersham)

Análisis Estadístico

La significación estadística de los resultados experimentales fue calculada por ANOVA de una o dos vías, dependiendo del diseño experimental. La significación estadística fue considerada como $p < 0.05$ como valor crítico del pos-test de Bonferroni o el pos-test de Dunnet. Para obtener el porcentaje de inhibición, los datos fueron normalizados sobre los valores obtenidos con IFN γ 100%. Los cálculos se realizaron utilizando el Graphpad PRISM3 Software.

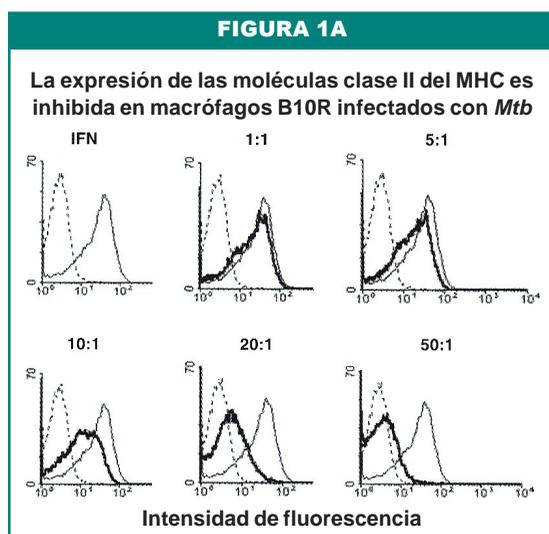
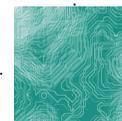
Resultados

La infección de los macrófagos con *Mtb* virulenta inhibe la expresión de los antígenos clase II

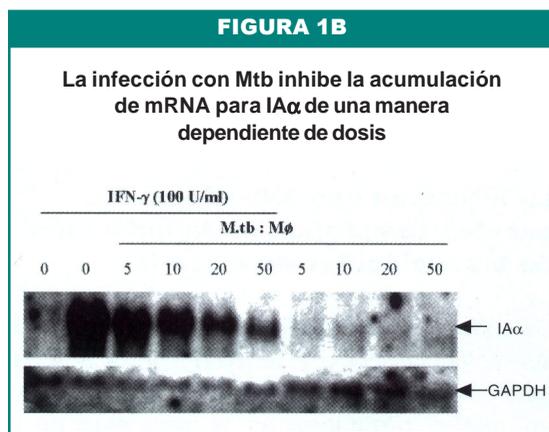
La línea celular de macrófagos murinos B10R no expresa antígenos clase II en ausencia de IFN γ , pero en presencia de esta citoquina hay un incremento dosis dependiente de la expresión superficial de estas moléculas (11,13,15). Para examinar el efecto de la infección con *Mtb* sobre la expresión de estas moléculas, las células fueron infectadas con diferentes relaciones micobacteria: macrófago (1:1, 5:1, 10:1, 20:1 y 50:1) y la expresión inducible con IFN γ fue determinada 24 horas después de la infección.

El análisis por citometría de flujo y los niveles de mRNA indicaron que no existía expresión basal y que esta fue máxima con 100 U/ml de IFN γ . La infección con *Mtb* viva inhibió de una manera dependiente de dosis la expresión en superficie de clase II. Se observó inhibición significativa con relaciones de 5:1 o mayores (Figura 1A). Para establecer si los niveles de inhibición de la expresión superficial de clase II (I-A) se correlacionaban con los niveles de mRNA, los macrófagos fueron estimulados con IFN γ , en presencia o ausencia de la micobacteria viva, y 24 horas después los niveles del mRNA para IA α fueron determinados por Northern-Blot.

Como se muestra en la Figura 1B, se encontró una reducción en el mRNA de IA α inducida por la infección. Una relación de 5:1 micobacteria:



Los macrófagos B10R fueron estimulados con $IFN\gamma$ (100 U/ml) y simultáneamente infectados con *Mtb* (1:1, 5:1, 10:1, 20:1 y 50:1 micobacterias:macrófagos). Veinticuatro horas después del tratamiento, el promedio de intensidad de fluorescencia de la expresión de clase II fue evaluada. La línea punteada representa el control isotípico con IgG2a, la línea delgada representa la expresión de clase II en presencia de $IFN\gamma$, la línea gruesa representa la expresión de clase II después de la infección con las diferentes dosis de *Mtb*.



Las células fueron cultivadas durante 24 horas en ausencia o presencia de $IFN\gamma$ y/o *Mtb* (5:1, 10:1, 20:1 y 50:1 micobacterias:macrófago). Diez microgramos del RNA total fueron transferidos a membranas de Nylon e hibridados con una sonda [^{32}P]cDNA $IA\alpha$.

macrófago fue suficiente para reducir la expresión de IA. Los niveles máximos de inhibición se alcanzaron con una relación 50:1.

Como control de los posibles efectos no específicos de la fagocitosis los macrófagos fueron incubados con relaciones de 5:1 y 10:1 de partículas fluorescentes simultáneamente con $IFN\gamma$. La captación de las partículas sólo ejerció un leve efecto en la expresión inducible de los antígenos clase II cuando se utilizó una relación 10:1 de partículas: macrófagos (datos no mostrados).

La micobacteria muerta por calor y las paredes celulares micobacterianas también inhiben la expresión en superficie de los antígenos clase II

Con el fin de determinar si la inhibición observada era dependiente de la actividad metabólica de la micobacteria, los macrófagos B10R fueron tratados con micobacterias muertas por calor (relación 50:1) e $IFN\gamma$. Como se observa en la Figura 2A, la fagocitosis de la micobacteria muerta por calor resultó en una reducción parcial, de la expresión superficial de las moléculas de clase II. Estos resultados sugieren que tanto un componente estructural, como la actividad metabólica de la micobacteria pueden estar involucrados en la inhibición.

Para evaluar esta última hipótesis los macrófagos fueron tratados simultáneamente con $IFN\gamma$ y paredes micobacterianas obtenidas de *M. bovis* BCG. Como se muestra en la Figura 2B, este tratamiento indujo una reducción significativa en la expresión de los antígenos clase II.

ManLAM parece no ser el componente de la pared celular involucrado en la inhibición de las moléculas clase II

El hallazgo de inhibición de la expresión de las moléculas de clase II por las paredes celulares nos llevó a evaluar si el ManLAM, uno de los componentes inmunomoduladores principales de la pared micobacteriana (16-18), estaba

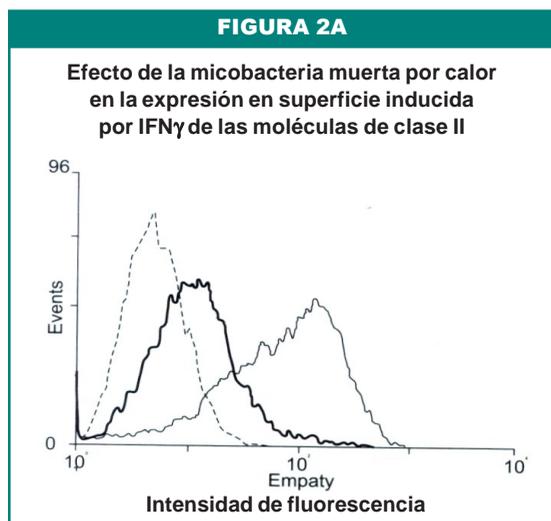
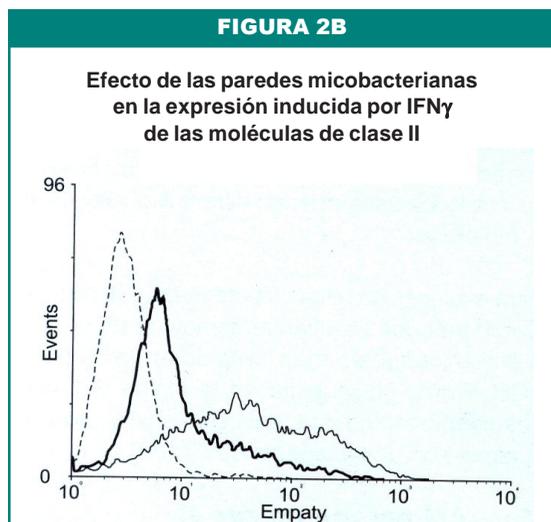
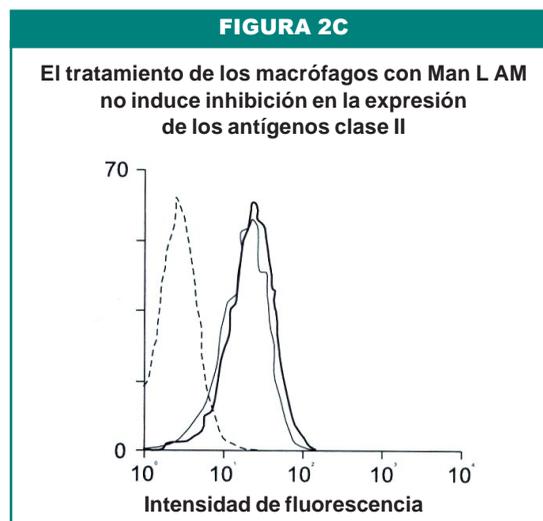


Figura 2(A): el tratamiento de los macrófagos con micobacterias muertas por calor resulta en una inhibición de la expresión de los antígenos clase II. Los macrófagos fueron tratados simultáneamente con IFN γ y micobacterias muertas por calor (50:1). Veinticuatro horas más tarde la expresión de las moléculas clase II fue determinada por citometría de flujo. La línea punteada representa el control isotípico con IgG2a, la línea delgada representa la expresión de clase II en presencia de IFN γ , la línea gruesa representa la expresión de clase II después de la infección con 50:1 micobacterias:macrófagos.



El tratamiento de los macrófagos con las paredes celulares micobacterianas inhibe la expresión en superficie de las moléculas clase II. Los macrófagos fueron tratados simultáneamente con IFN γ (100 U/ml) y paredes micobacterianas (10 μ g/ml). La expresión en superficie de las moléculas clase II fue determinada por citometría de flujo 24 horas más tarde. La línea punteada representa el control isotípico con IgG2a, la línea delgada representa la expresión de clase II en presencia de IFN γ , la línea gruesa representa la expresión de clase II después del tratamiento con paredes micobacterianas.

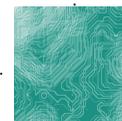


Los macrófagos fueron tratados simultáneamente con IFN γ (100 U/ml) y ManLAM (10 μ g/ml) durante 24 horas. La línea punteada representa el control isotípico con IgG2a, la línea negra delgada representa la expresión de clase II en presencia de IFN γ , la línea negra gruesa representa la expresión de clase II después del tratamiento con ManLAM.

involucrado en la inhibición de la expresión de estas moléculas. Como se observa en la Figura 2C, el tratamiento simultáneo de los macrófagos con IFN γ y ManLAM no llevó a la inhibición observada previamente, lo cual se sugiere que otro componente(s) de la pared micobacteriana deberán ejercer este efecto inhibitorio.

La infección con *Mtb* afecta los eventos tempranos en la inducción de las moléculas de clase II

Se conoce en la actualidad que la expresión de las moléculas clase II en respuesta a IFN γ es dependiente de la activación de JAK1 y JAK2 las cuales participan en la inducción de la fosforilación posterior de STAT1 (19). Quisimos entonces examinar la posibilidad de que la inhibición de la expresión de clase II se debía a una alteración de las señales a través de la vía JAK-STAT. Los macrófagos fueron estimulados con IFN γ y simultáneamente infectados con diferentes relaciones micobacteria:macrófago. Después de 30 minutos, los lisados celulares fueron obtenidos y evaluados para la fosforilación en tirosina de JAK2 y STAT1. Los resultados que se muestran en la Figura 3 indican que la infección



con *Mtb* disminuye la fosforilación de la tirosina de JAK2 y STAT1 disminución, dependiente de la dosis de micobacteria utilizada.

La expresión en superficie del receptor de IFN γ no fue inhibida por la infección con *Mtb*

Algunas evidencias recientemente publicadas han mostrado que la infección de macrófagos con *M. avium* condujeron a una reducción en el mRNA de las cadenas α y β del IFN γ R (10). Con el fin de determinar si este mismo mecanismo operaba en estos macrófagos, las células fueron infectadas con *Mtb* durante 1, 4, 8 y 12 horas en presencia de IFN γ , y 24 horas después de la adición de la citoquina se determinó la expresión en superficie de las cadenas α o β del receptor. Como se observa en la Figura 4, no se observó reducción en el porcentaje de las células que expresan ya sea la cadena α o β del receptor en ninguno de los tiempos evaluados.

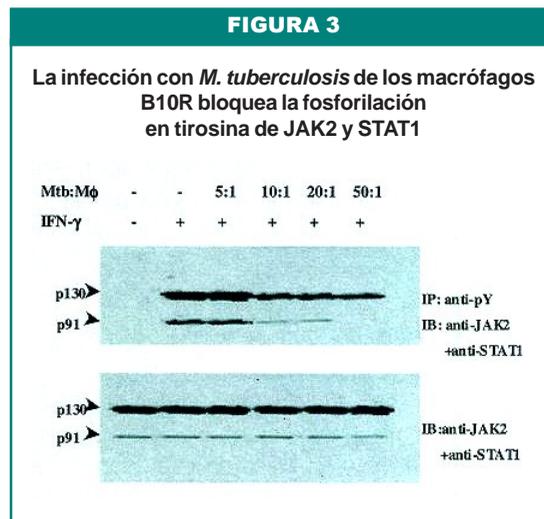
La expresión en superficie de los antígenos del MHC clase I, también se inhibe por la infección con *Mtb*

Previamente se ha demostrado que la regiones promotoras de los antígenos clase I y II comparan homología estructural, y que ellas son reguladas por factores de transcripción comunes, incluyendo CIITA (20-24) y el factor RFX5 (21). Se decidió entonces evaluar si la expresión inducida por IFN γ de clase I era también inhibida por la infección con *Mtb*.

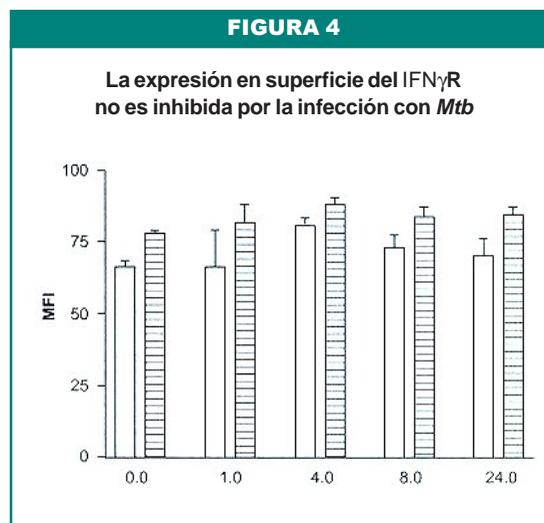
Los resultados presentados en la Figura 5 muestran la cinética de reducción observada en la expresión de clase I inducida en el macrófago por el tratamiento con IFN γ . De manera interesante no se observó ninguna modulación en la expresión basal de clase I.

La inhibición de los antígenos MHC clase I y II por la infección con *Mtb* se correlaciono con la inhibición de la expresión de CIITA

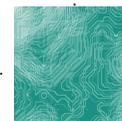
Finalmente, nosotros evaluamos si la expresión



Los macrófagos fueron estimulados con IFN γ y simultáneamente infectados con *Mtb* en relaciones 5:1, 10:1, 20:1 y 50:1 micobacteria:macrófago. 30 minutos después del tratamiento los lisados celulares fueron preparados e inmunoprecipitados con anti-fosfotirosina e inmunodetectados con anti STAT1 y anti JAK2.



Los macrófagos fueron estimulados con IFN γ (100 U/ml) e infectados simultáneamente con micobacterias vivas. La expresión en superficie de las cadenas α (barra blanca) y β (barra rayada) del receptor fue determinada por citometría de flujo 1, 4, 8 y 24 horas después del tratamiento.



de CIITA, el coactivador clave en la expresión de ambos antígenos clase II y clase I era modulada por la infección de los macrófagos B10R infectados con el bacilo tuberculoso. Como se observa en la Figura 6, los niveles del mRNA para CIITA inducidos por $\text{IFN}\gamma$ disminuyeron de una manera dependiente de la relación de infección.

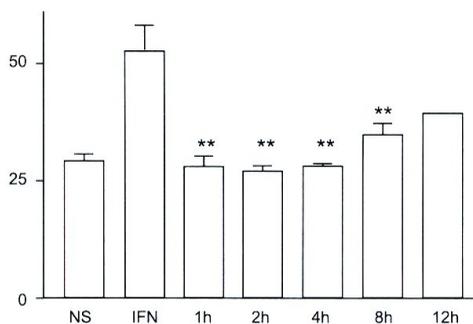
Discusión

Los mecanismos moleculares por los cuales las infecciones micobacterianas inhiben la expresión de las moléculas del MHC en macrófagos han comenzado a ser exploradas recientemente. Cuando se evaluaron macrófagos derivados de monocitos humanos infectados con *Mtb*, se observó un efecto inhibitorio en las señales de $\text{IFN}\gamma$, el cual se atribuyó a la interferencia de la micobacteria con la interacción de CBP/p300 con STAT1, interacción necesaria para la expresión de los genes inducidos por $\text{IFN}\gamma$ (12). En el caso de macrófagos murinos infectados con *M. avium* se encontró una disminución en la cantidad citoplasmática de las cadenas α y β del $\text{IFN}\gamma\text{R}$, lo que podría explicar la reducción observada en la fosforilación de JAK1, JAK2 y SAT1, con la consecuente disminución de los genes inducidos por $\text{IFN}\gamma$, incluyendo clase II, IRF1 y CIITA (10). Nuestros resultados utilizando *Mtb* corroboran que las infecciones micobacterianas interfieren con la cascada de señales disparadas por el $\text{IFN}\gamma$ a través de la inhibición de la vía JAK-STAT. Sin embargo, nosotros no pudimos detectar una disminución en la expresión en superficie de las cadenas α y β del receptor en todos los períodos de tiempo estudiados, por ende nuestros resultados utilizando los macrófagos B10R no pueden ser explicados por disminución en el $\text{IFN}\gamma\text{R}$ como previamente se ha informado con la infección por *M. avium* (10).

Nuestros datos indican que tanto micobacterias vivas como muertas inducen una inhibición significativa. Sin embargo, la micobacteria viva induce una mayor inhibición de los antígenos clase II del MHC, comparada con la micobacteria muerta como se había reportado previamente (9).

FIGURA 5

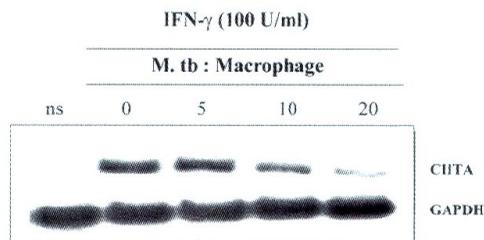
La infección de los macrófagos B10R con *Mtb* interfiere con la expresión inducible por $\text{IFN}\gamma$ de los antígenos clase I



Los macrófagos fueron infectados con micobacterias vivas 1, 4, 8, y 12 horas previas al estímulo con $\text{IFN}\gamma$. Veinticuatro horas después de la estimulación con la citoquina la expresión en superficie de los antígenos clase I fue evaluada por citometría de flujo.

FIGURA 6

La expresión del transactivador de clase II (CIITA) está disminuida en macrófagos infectados con micobacterias vivas



Los macrófagos B10R fueron estimulados con $\text{IFN}\gamma$ (100 U/ml) e infectados simultáneamente con micobacterias vivas. Veinticuatro horas después de la estimulación el RNA fue obtenido y los niveles de CIITA y GAPDH fueron determinados por RT-PCR semicuantitativo.



Estas observaciones sugieren que los efectos de la infección de macrófagos B10R con *Mtb* dependen al menos parcialmente de la actividad metabólica del microorganismo.

Nosotros también investigamos si el ManLAM, uno de los constituyentes de la pared micobacteriana y conocido como un potente desactivador del macrófago (16-18), se relacionaba con la inhibición observada en los antígenos clase II. Nuestros resultados indican que el tratamiento con ManLAM no inhibe la expresión de antígenos clase II. Resultados similares han sido reportados para la expresión del FcR γ l en macrófagos humanos (12). Dado que los efectos desactivadores del ManLAM han sido observados cuando los macrófagos han sido tratados por varias horas antes de la adición del IFN γ , y/o con la adición de altas dosis de ManLAM (16,17), es posible que nuestros resultados se deban a un efecto del tratamiento simultáneo, combinado con la utilización de dosis menores de ManLAM. Sin embargo, el hecho de que la preinfección con *Mtb* tenga un impacto dramático sobre la expresión de los MHC, podría sugerir la activación de proteína fosfatasa tales como SHP-1, como se ha observado con ManLAM (18). Evidencias publicadas recientemente (14) indican que la infección de macrófagos murinos con *Leishmania donovani* induce rápidamente la activación de SHP-1, con una defosforilación simultánea en tirosina y una inhibición de la actividad tirosina quinasa.

Una explicación alternativa a la inhibición de la expresión de los MHC en los macrófagos B10R infectados con *Mtb* sería la inducción de la producción de citoquinas desactivadoras del macrófago, tales como IL-10 y TGF β (26-28). Previamente se ha descrito que la infección de macrófagos con *Mtb* induce la producción de TGF β (29) y además que el TGF β induce una disminución en CIITA y por ende en los antígenos clase II (30). Además se ha descrito recientemente que la IL-10 puede disminuir la expresión de antígenos clase II, ya sea inhibiendo el transporte intracelular de las vesículas que llevan nuevas moléculas de clase II (28), o a través de la inhibición de la fosforilación de STAT1 (27).

El hallazgo de la disminución de la expresión de las moléculas de clase II en macrófagos murinos infectados con *Mtb*, se correlaciona con hallazgos en mononucleares provenientes de pacientes tuberculosos (31) o monocitos de pacientes sanos infectados con *Mtb* (32), en los que se observó una disminución en la expresión del HLA-DR. Los mecanismos de esta regulación negativa de las moléculas del MHC en el sistema humano, están en proceso de ser clarificados. En individuos con tuberculosis se ha encontrado aumento en la producción de IL-10 y TGF β que pudieran explicar esta reducción, pero ella podría ser una consecuencia directa de la infección. Así el evento de la inhibición de la expresión de los antígenos del MHC puede tener importantes consecuencias inmunológicas en los humanos infectados con *Mtb*. **b**

Abstract

The results of this investigation shows a novel mechanism by which infection of macrophages with *M. tuberculosis* results in IFN- γ -induced MHC down regulation. After infection of the macrophages, class II surface protein and mRNA, and surface class I are inhibited in a dose-dependent manner. Incubation of macrophages with dead mycobacteria and mycobacterial cell walls but not mannosylated lipoarabinomannan (ManLAM) caused this inhibition. Kinetic analysis indicated that early events subsequent to IFN- γ stimulation of macrophages might be compromised by infection with *M. tuberculosis*. Tyrosine phosphorylation of Janus kinase JAK2 and of the transcription factor STAT1 was reduced in a dose-dependent manner upon infection with the virulent bacteria. However, surface expression of the α and β chains of the IFN- γ R were not reduced in infected macrophages during the periods of time studied. The down-regulation of class II and class I antigens may be a consequence of the reduced gene expression levels of the coactivator CIITA in macrophages infected with *M. tuberculosis*. These results indicate that *M. tuberculosis* may subvert the host immune response by down regulating the response induced by IFN- γ . **Key words:** MHC antigens, *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, JAK-STAT pathway.



Referencias

1. **Redpath, S., A. Angulo, N. R. J. Gascoigne, and P. Ghazal.** Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages by induction of IL-10. *J. Immunol.* 1999; 162: 6701.
2. **Keller, R., R. Keist, and P. Joller.** Macrophage response to microbial pathogens: modulation of the expression of adhesion, CD14, and MHC class II molecules by viruses, bacteria, protozoa, and fungi. *Scand. J. Immunol.* 1995; 42: 337.
3. **Zhong, G., T. Fan, and L. Liu.** Chlamydia inhibits interferon γ -inducible major histocompatibility complex class II expression by degradation of upstream stimulatory factor 1. *J. Exp. Med.* 1999; 189: 1931.
4. **Reiner, N. E., W. Ng, T. Ma, and W. R. McMaster.** Kinetics of γ interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988; 85: 4330.
5. **Luder, C. G., T. Lang, B. Beuerle, and U. Gross.** Down-regulation of MHC class II molecules and inability to up-regulate class I molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*. *Clin. exp. Immunol.* 1998; 112: 308.
6. **Reiner, N., W. Ng, and R. McMaster.** Parasite accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J. Immunol.* 1987; 138: 1926.
7. **Kaye, P. M., M. Sims, and M. Feoldman.** Regulation of macrophage accessory cell activity by mycobacteria. II. *In vitro* inhibition of Ia expression by *Mycobacterium microti*. *Clin. exp. Immunol.* 1986; 64: 28.
8. **Mshana, R. N., R. C. Hastings, and J. L. Krahenbuhl.** Infection with live mycobacteria inhibits *in vitro* detection of Ia antigen on macrophages. *Immunobiol.* 1988; 177: 40.
9. **Hmama, Z., R. Gabathuler, W. A. Jefferies, G. de Jong, and N. E. Reiner.** Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers. *J. Immunol.* 1998; 161: 4882.
10. **Hussain, S., B. S. Zwilling, and W. P. Lafuse.** *Mycobacterium avium* infection of mouse macrophages inhibits IFN- γ Janus kinase-STAT signaling and gene induction by down-regulation of the IFN- γ receptor. *J. Immunol.* 1999; 163:2041.
11. **Wojciechowski, W., J. Desanctis, E. Skamene, and D. Radzioch.** Attenuation of MHC class II expression in macrophages infected with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin involves class II transactivator and depends on the *Nramp1* gene. *J. Immunol.* 1999; 163: 2688.
12. **Ting, L., A. C. Kim, A. Cattamanchi, and J. D. Ernst.** *Mycobacterium tuberculosis* inhibits IFN- γ transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *J. Immunol.* 1999; 163: 3898.
13. **Radzioch, D., T. Hudson, M. Boule, L. Barrera, J. W. Urbance, L. Varesio, and E. Skamene.** Genetic resistance/susceptibility to mycobacteria: Phenotypic expression in bone marrow-derived macrophage lines. *J. Leuk. Biol.* 1991; 50: 263.
14. **Blanchette, J., N. Raccette, R. Faure, K. A. Siminovitch, and M. Olivier.** *Leishmania*-induced increase in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29: 3737.
15. **Barrera, L.F., Skamene, E., and Radzioch, D.** I-A β gene expression in macrophages derived from mice susceptible or resistant to infection with *M. bovis* BCG. *Molecular Immunol.* 1997; 34:343
16. **Sibley, L. D., S. W. Hunter, P. J. Brennan, and J. L. Krahenbuhl.** Mycobacterial lipoara-



- binomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infect. Immun.* 1988; 56: 1232.
17. **Sibley, L. D., L. B. Adams, and J. L. Krahenbuhl.** Inhibition of interferon-gamma-mediated activation in mouse macrophages treated with lipoarabinomannan. *Clin. Exp. Immunol.* 1990; 80: 141.
 18. **Knutson, K. L., Z. Hmama, P. Herrera-Velit, R. Rochford, and N. E. Reiner.** Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* promotes protein tyrosine dephosphorylation and inhibition of mitogen-activated protein kinase in human mononuclear phagocytes. Role of the Src homology 2 containing tyrosine phosphatase 1. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 645.
 19. **Stark, G. R., I. M. Kerr, B. R. G. Williams, R. H. Silverman, and R. D. Schreiber.** How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 1998; 67: 227.
 20. **van den Elsen, P. J., A. Peijnenburg, M. C. J. A. van Eggermond, and S. J. P. Gobin.** Shared regulatory elements in the promoters of MHC class I and class II genes. *Immunology Today* 1998; 19: 34.
 21. **Gobin, S. J. P., A. Peijnenburg, V. Keijzers, and P. J. van den Elsen.** Site α is crucial for two routes of IFN γ -induced MHC class I transactivation: the ISRE-mediated route and a novel pathway involving CIITA. *Immunity* 1997; 6: 601.
 22. **Martin, B. K., K. Chin, J. C. Olsen, C. A. Skinner, A. Dey, K. Ozato, and J. P.-Y. Ting.** Induction of MHC class I expression by the MHC class II transactivator CIITA. *Immunity* 1997; 6: 591.
 23. **Lefebvre, S., P. Moreau, P. Dausset, E. D. Carosella, and P. Paul.** Downregulation of HLA class I gene transcription in choriocarcinoma cells is controlled by the proximal promoter element and can be reversed by CIITA. *Placenta* 1999; 20: 293.
 24. **Gobin, S. J. P., A. Peijnenburg, M. van Eggermond, M. van Zutphen, R. van den Berg, and P. J. van den Elsen.** The RFX complex is crucial for the constitutive and CIITA-mediated transactivation of MHC class I and β 2-microglobulin genes. *Immunity* 1998; 9: 531.
 25. **Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J. C. Howard.** Cellular responses to interferon- γ . *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15: 749.
 26. **Lee, Y., Y. Han, H. Lu, V. Nguyen, H. Qin, P. H. Howe, B. A. Hocevar, J. M. Boss, R. M. Ransohoff, and E. N. Benveniste.** TGF- β suppresses IFN- γ induction of class II MHC gene expression by inhibiting class II transactivator messenger RNA expression. *J. Immunol.* 1997; 158: 2065.
 27. **Ito, S., P. Aneri, M. Sakatsume, H. Dickensheets, N. Vasquez, R. P. Donnelly, A. C. Larner, and D. S. Finbloom.** Interleukin-10 inhibits expression of both interferon- α and interferon- γ -induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT-1. *Blood* 1999; 93: 1456.
 28. **Koppelman, B., J. J. Neefjes, J. E. de Vries, and R. de Waal Malefyt.** Interleukin-10 down-regulates MHC class II $\alpha\beta$ peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity* 1997; 7: 861.
 29. **Schlesinger, L.S.,** Role of Mononuclear Phagocytes in *M tuberculosis* Pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 1996; 44: 312.
 30. **Lee, Yi-ju, Han, Y. Lu, HT. Nguyen, V. Qin, H. Howe, PH. Hocevar, BA. Boss, J. Ransohoff, RM. Benveniste, EN.** TGF β Suppress IFN γ induction of class II MHC Transactivator Messenger RNA Expression. *J. Immunol.* 1997; 158: 2065.
 31. **Tweardy, D. J., B. Z. Schacter, and J. J. Ellner.** Association of altered dynamics of monocyte surface expression of human leukocyte antigen DR with immunosuppression in tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 1984; 149: 31.
 32. **Gercken, J., J. Pryjma, M. Ernst, and H. Flad.** Defective antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*-infected monocytes. *Infect. Immun.* 1994; 62: 3472.