



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO DE FAGOSOMAS MICOBACTERIANOS

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
KAREN BOBADILLA LOZOYA

DIRECTOR DE TESIS
DRA. MARTHA TORRES ROJAS
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

COMITÉ TUTOR
DR. EDUARDO GARCÍA ZEPEDA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. ALFONSO GONZÁLEZ NORIEGA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D. F. 10 de ENERO DE 2013



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO DE FAGOSOMAS MICOBACTERIANOS

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

ALUMNA:

KAREN BOBADILLA LOZOYA

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. MARTHA TORRES ROJAS

COMITÉ TUTORAL:

DR. ALFONSO GONZÁLEZ NORIEGA

DR. EDUARADO GARCÍA ZEPEDA

AGRADECIMIENTOS

Director de tesis:

Dra. Martha Torres Rojas

Comité tutorial:

Dr. Eduardo García Zepeda

Dr. Alfonso González Noriega

Miembros del jurado:

Dra. Yolanda López Vidal

Dra. Clara I. Espitia Pinzón

Dr. Rafael D. Saavedra

Dra. María Teresa Herrera Barrios

QFB. María Esther Jaime Capetillo

Dr. Alfonso Gozález Noriega y Biol. Colette Michalak

Dr. Sigifredo Pedraza Sánchez

A todos los voluntarios sanos que participaron en este proyecto.

DEDICATORIAS

Efrén: Para el amor de mi vida, gracias tu apoyo, por creer en mí, por tu paciencia, por tus palabras de aliento en el preciso momento. Gracias por emprender el camino de la vida agarrado de mi mano dese hace más de diez años. Mi admiración al médico, al padre, al esposo pero sobre todo al gran ser humano que eres, y en el que me he convertido gracias a ti. TE AMO.

Efrén y Yussef: Mi vida, mi alma, mi corazón y TODO lo que hago es por ustedes y para ustedes, los AMO.

Papas: Gracias por su apoyo, por todos los años de formación y amor que me han dado. Papá gracias por siempre creer en mí, y darme siempre ánimo para seguir, toda mi admiración para ti. Mamá, siempre mi modelo a seguir, el equilibrio que siempre había buscado, y que ahora encuentro, mi guía, mi mayor crítica, pero sobre todo mi MADRE, TE AMO.

Nancy y Ligia: A las compañeras de mi vida, gracias por enseñarme tantas cosas, las amo.

Emiliano, Fátima, y Marifer: A ustedes, por ser parte de mí y de mi vida.

Blanquita, Efrén, Paula, Adrián y Farid: Este largo camino lo empezamos juntos, muchas gracias por su apoyo incondicional.

Angélica, Blanca, Cinthya, Gaby, Marcela y Saly: Gracias por estar conmigo en todo el camino de mi vida.

Teté, Silvia, y Fernando: Gracias por su apoyo, pero sobre todo por su amistad incondicional.

ÍNDICE:

Abreviaturas_____	6
Resumen_____	7
Introducción _____	9
Justificación_____	19
Hipótesis_____	19
Objetivo_____	20
Material y Métodos_____	21
Resultados_____	31
Discusión_____	53
Limitaciones_____	60
Conclusiones_____	60
Perspectivas_____	61
Referencias_____	62
Anexos_____	67

ABREVIATURAS

Bacilo de Calmette Guerin	BCG
Cadena invariante (invariant chain)	Ii
Compartimentos de moléculas de clase II	MIIC
Macrófagos derivados de monocitos	MDMs
Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad	MHC
Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I	MHC-I
Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II	MHC-II
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mtb</i>
Óxido nítrico sintetasa inducible	iNOS
Proteínas de membrana asociadas al lisosoma 1 y 2	LAMP-1, LAMP-2
Proteína con una cubierta rica de triptófano y aspartato	TACO
Péptido de cadena invariante asociado a clase II	CLIP
Receptores de complemento 1,3,4	CR1, CR3, CR4
Tuberculosis	TB
Prueba de la tuberculina (Tuberculin skin test)	TST

RESUMEN

Los patógenos intracelulares, como *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), residen en los fagosomas dentro de los macrófagos, este es el sitio donde se inicia el procesamiento antigénico. Los complejos péptido-MHC-II se forman dentro del fagosoma, para posteriormente ser transportados a la membrana plasmática. Las citocinas como el IFN- γ y la IL-10 juegan un papel importante la infección por *Mtb*; sin embargo no se conoce el papel de estas citocinas en la formación de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II. En este trabajo analizamos la localización subcelular de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II en macrófagos derivados de monocitos (MDMs) humanos infectados con *Mtb* mediante el uso de células T CD4⁺ autólogas específicas para antígenos micobacterianos. Las células MDMs se pre-trataron con IFN- γ o IL-10 y se infectaron con *Mtb*, a continuación fueron homogenizadas mecánicamente y separadas en un gradiente de densidad en Percoll al 27%. Se fraccionaron manualmente y las fracciones obtenidas se incubaron con células T CD4⁺ autólogas. Nuestros resultados demuestran que en MDMs pre-tratados con IFN- γ , los complejos *Mtb* péptido-MHC-II se detectaron en fracciones fagosomales, mientras que en ausencia de IFN- γ estos complejos se localizaron en las fracciones endosomales. Por otro lado en las MDMs pre-tratadas con IL-10 los complejos se detectaron en las fracciones endosomales y no fueron detectados en fracciones de membrana plasmática. Utilizando la técnica de microscopía de inmunofluorescencia se detectó el Ag85B asociado a las

moléculas HLA-DR en la membrana celular de los MDMs pre-tratados con IFN- γ , lo que sugiere que el IFN- γ acelera el procesamiento y la presentación antigénica de *Mtb*. En contraste, la IL-10 favorece la detección del antígeno Ag85B en vesículas que no contienen la proteína asociada al lisosoma 1 (LAMP-1). Por lo tanto, el IFN- γ e IL-10 juegan un papel importante en la formación y el tráfico de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II.

INTRODUCCION

La tuberculosis (TB) continúa representando un problema de salud pública en el mundo. La OMS estimó que en el 2010, se produjeron 8.8 millones de casos y un millón de muertes por esta enfermedad [1] . En México la incidencia es de 16 por cada 100,000 habitantes [1].

Actualmente la *Mycobacterium Bovis* (BCG) es la única vacuna disponible en el control de la TB, sin embargo, en diferentes regiones geográficas su eficacia varía desde 0 hasta el 80% [2, 3]. Por otro lado, el desarrollo de una vacuna que confiera mayor protección es limitado por la falta de conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que participan en la generación de una respuesta inmune protectora.

El agente causal de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) es un patógeno intracelular; el cual, es fagocitado por fagocitos profesionales tales como macrófagos y células dendríticas [4]. Una gran variedad de receptores promueven la fagocitosis de *Mtb*, como los receptores de complemento CR1, CR3, y CR4, el receptor de manosa, y el receptor scavenger (carroñeros) tipo A [5]. Después de la fagocitosis, *Mtb* reside en vesículas fagosomales derivadas de la membrana plasmática del macrófago, siendo en el fagosoma donde se inicia el procesamiento antigénico de *Mtb* por acción de las enzimas lisosomales que el fagosoma adquiere durante el proceso de maduración fagosomal [4]. Mientras la mayoría de los fagosomas bacterianos continúan con un proceso de acidificación y

maduración, se ha descrito que *Mtb* inhibe este proceso [6-8]. De acuerdo a lo anterior, *Mtb* no sólo inhibe la acción bactericida del macrófago sino que también inhibe el procesamiento antigénico, mecanismo importante para la presentación antigénica y activación de células T [9-11].

En modelos animales y en humanos se demostró que las células T CD4⁺ son importantes para el control de la infección por *Mtb* y que son activadas cuando antígenos micobacterianos son procesados y presentados por el complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II) [12, 13]. Por lo tanto el procesamiento de antígenos micobacterianos es un paso importante en la generación de una respuesta inmune en la TB.

FAGOCITOSIS DE *M. tuberculosis*.

La fagocitosis es una forma especializada de endocitosis, en la que microorganismos o partículas relativamente grandes son internalizados en una vesícula denominada fagosoma [14]. La fagocitosis de *Mtb* involucra la participación de receptores, como los de complemento CR1, CR3, CR4, Fc, manosa, carroñeros tipo A (scavenger), proteína surfactante, entre otros [5, 15, 16].

La importancia de los receptores del complemento en la fagocitosis de *Mtb* se ha demostrado en experimentos con macrófagos y monocitos humanos, en los que el bloqueo de CR3 disminuye la adherencia y fagocitosis de *Mtb* hasta en un 80% [17]. Shorey JS et al, [18] describieron que *Mtb* activa la vía clásica del complemento por medio de la unión a C2a, aún en ausencia de C4b, siendo un

mecanismo que facilita su entrada a un microambiente bajo de opsoninas, como el pulmón.

Se ha descrito que las rutas para la internalización de *Mtb* podrían establecer una diferencia en la transducción de la señal a nivel intracelular, la activación de la respuesta inmune y la supervivencia de *Mtb* intracelular. Así, Aderem A et al, [19] reportaron que la fagocitosis de *Mtb* a través de los receptores Fc está directamente ligada a una respuesta inflamatoria, mientras que Pasula R et al, [20, 21], demostraron que la fagocitosis de *Mtb* por medio del receptor de la proteína de surfactante A en los macrófagos alveolares suprime a los intermediarios reactivos del nitrógeno, mecanismo con actividad antimicobacteriana en modelos murinos. A su vez, Schlesinger LS et al, [22] describieron que la fagocitosis de cepas virulentas de *Mtb* como la H37Rv y la Erdman, involucra a los receptores de manosa, en contraste a cepas atenuadas como H37Ra. En el modelo de ratón se demostró que el bloqueo de los receptores de complemento y de manosa no inhibe la fagocitosis de *Mtb*, demostrando que se internaliza por medio de otros receptores, como por ejemplo, los receptores scavenger [23].

BIOGÉNESIS DEL FAGOSOMA

Después de la fagocitosis de un patógeno intracelular se inicia la formación del fagolisosoma, que tiene como finalidad la muerte del microorganismo y la degradación de su contenido [24, 25]. Este proceso se realiza por la adquisición de enzimas lisosomales mediante un proceso complejo de maduración caracterizado por la fusión secuencial con endosomas tempranos, endosomas tardíos y finalmente con lisosomas para formar los fagolisosomas [26, 27].

Los fagosomas que contienen partículas inertes continúan con una serie de eventos de fusión de membrana con subcompartimentos individuales de la vía endocítica: los fagosomas tempranos selectivamente se fusionan con los endosomas tempranos clasificados como endosomas de reciclaje, los fagosomas intermedios con endosomas tardíos los cuales tienen un pH moderadamente ácido, (pH 6.1) lo que les confiere el inicio de la actividad hidrolítica, y los fagosomas tardíos con lisosomas, a este proceso se le ha denominado como de "besa y corre" (kiss and run) donde los endosomas, lisosomas y fagosomas forman organelos híbridos transitorios lo que permite el intercambio selectivo de componentes de membrana y luminal [28]. Estos eventos de fusión son controlados por un subtipo de GTPasas, las proteínas Rab, que incluyen Rab5 y Rab7, las cuales se encargan de regular la fusión con endosomas tempranos y tardíos, respectivamente [28, 29]. Durante el proceso de maduración fagosomal, la acidificación y los niveles de enzimas lisosomales como las hidrolasas ácidas, proteínas de membrana asociadas al lisosoma 1 y 2 (LAMP-1, LAMP-2), catepsina D, así como la GTPasa Rab7 aumentan; mientras que los marcadores endocíticos tempranos como CD63, el receptor de transferrina, Rab5, disminuyen dentro del fagosoma [30]. De esta manera, una vez fagocitados, muy pocos microorganismos pueden sobrevivir dentro de los fagosomas del macrófago debido a la abundancia de vacuolas fagocíticas ácidas y enzimas hidrolíticas que contienen hidrolasas lisosomales, así como la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) enzima generadora de los metabolitos intermediarios de nitrógeno, responsable de la capacidad microbicida del macrófago [31].

EL FAGOSOMA MICOBACTERIANO

La supervivencia de *Mtb* dentro del fagosoma se debe a la capacidad de la bacteria de inhibir algunos de los pasos en la maduración fagosomal mediante la acción de productos micobacterianos como los fosfatidilinositoles; que bloquean el tráfico membranal mediante la inhibición de la enzima fosfatidilinositol 3 cinasa [32]. En la década de los 70, Hart et al [33] demostraron por microscopía electrónica que los fagosomas que contienen *Mtb* viva no se fusionan con los lisosomas previamente marcados con ferritina, y no adquieren la tinción de fosfatasa ácida, inhibiendo la adquisición de enzimas lisosomales, impidiendo la maduración fagosomal. Más tarde, Clemens et al, [24] demostraron que los fagosomas que contienen *Mtb* muerta por calor se fusionan con los lisosomas, mientras que fagosomas con *Mtb* viva resisten la fusión con los lisosomas. Recientemente se describió que la presencia de *Mtb* en el fagosoma inhibe la adquisición de la enzima oxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), asegurando así su supervivencia. El mecanismo propuesto mediante el cual *Mtb* inhibe el reclutamiento de iNOS al fagosoma involucra la disminución de la retención de la proteína EP50, importante para la unión de iNOS al citoesqueleto [34]. Indicando la supervivencia de *Mtb* en el fagosoma en el modelo murino.

Los fagosomas que contienen *Mtb* presentan las siguientes características: limitada acidificación, [35] disminuida fusión con vesículas lisosomales y un incremento en la acumulación de marcadores de endosomas tempranos, como el receptor de transferina en la membrana fagosomal, Rab5, [36] y la acumulación de

una proteína con una cubierta rica de triptófano y aspartato (TACO, por sus siglas en inglés) [37]. Asimismo, el fagosoma que contiene *Mtb* no adquiere Rab7, marcador específico para endosomas tardíos, mientras que se ha observado la retención de Rab5, marcador de endosomas tempranos [38, 39].

Entre los productos micobacterianos que se han asociado con la inhibición de la maduración fagosomal se encuentran lipoarabinomanana, fosfatidil inositol y la lipoproteína de 19 kDa [40]. Se ha reportado que la lipoproteína de 19 kDa de *Mtb* disminuye la expresión de moléculas de clase II en macrófagos humanos por una vía dependiente del receptor Toll 2 (TLR2) e inhibe el procesamiento de antígenos, lo que permite su supervivencia [41, 42]. La inhibición causada por *Mtb* en la maduración fagosomal presumiblemente resulta en un fagosoma que es parcialmente acidificado y no se fusiona con lisosomas, donde la supervivencia de *Mtb* es exitosa, sin embargo las enzimas presentes en el fagosoma son suficientes para generar péptidos producto de la degradación enzimática de *Mtb* con capacidad para activar a las células T e inducir una respuesta inmune.

PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS MICOBACTERIANOS

Para la activación de la respuesta inmune adaptativa específica, el procesamiento y la presentación antigénica juegan un papel central [11, 12]. Los antígenos exógenos, tanto solubles como particulados, son internalizados por los macrófagos y son catabolizados por proteasas como la aspartil-proteasa (catepsina D) y la cisteína-proteasa (catepsina B), en el fagosoma o en los organelos endocíticos tardíos para generar péptidos, que se unirán a las moléculas del MHC [9, 36, 38].

Las moléculas del MHC son proteínas importantes cuya función es presentar los péptidos generados durante el procesamiento antigénico a las células T. Existen dos tipos de moléculas codificadas por el locus del MHC, las llamadas clase I y clase II. Las moléculas del MHC-II presentan péptidos a las células T CD4⁺ y MHC de clase I, presentan péptidos a las células T CD8⁺ [43, 44].

La mayoría de los péptidos procesados en el citosol son presentados por moléculas MHC-I, mientras que la mayoría de los péptidos procesados en compartimentos endosomales y fagocíticos son presentados por las moléculas MHC-II [45]. Por esta razón nos enfocaremos a la unión de los péptidos con las moléculas de clase II, previamente procesados en el fagosoma y compartimentos endosomales. Las moléculas MHC-II son sintetizadas en el retículo endoplásmico y se asocian a una proteína conocida como cadena invariante (*invariant chain* Ii), la cual promueve el ensamble de la molécula de clase II y dirige su transporte a las vesículas endocíticas, llamadas compartimentos de moléculas clase II [46]. Dentro de estos compartimientos la cadena Ii es degradada por proteasas endosomales/lisosomales, dejando a las moléculas de MHC-II asociadas a un fragmento de la Ii, llamado péptido de Ii asociado a clase II (CLIP), el cual ocupa la hendidura de unión al péptido. Posteriormente, otra molécula también codificada por los genes del MHC, el antígeno leucocitario humano, conocido como HLA-DM, actúa como intercambiador de péptidos y cataliza el reemplazo de CLIP por péptidos generados por la proteólisis fagosomal o endocítica [47]. Finalmente, los complejos péptido-MHC-II son transportados a la membrana plasmática del

macrófago para ser presentados a las células T CD4⁺, y estimular dichas células para la inducción de mediadores moleculares como las citocinas.

Hasta hace algunos años se sabía que los complejos péptido-MHC clase II se formaban en las vesículas endocíticas, llamadas compartimentos de moléculas clase II (MIIC); sin embargo, se sabe que se pueden formar en otros compartimentos intracelulares. Harding et al reportó que algunos epítopes derivados de la lisozima de huevo de gallina (HEL) así como ribonucleasa bovina se unen a las MHC-II en compartimentos endosomales [48, 49], lo que sugiere que los complejos péptido-MHC-II se pueden formar en otros compartimentos intracelulares y no solamente en las vesículas endocíticas .

Más tarde Ramachandra L et al [50], demostraron que los fagosomas son organelos competentes como sitio de formación de los complejos péptido- MHCII. Además, el mismo grupo de investigadores demostró en macrófagos de ratón que *Mtb* viva altera la maduración del fagosoma, disminuyendo el procesamiento antigénico en el contexto de MHC-II alterando la capacidad del fagosoma como sitio de formación de los complejos péptido-MHC clase II en comparación con los fagosomas que contienen a la bacteria muerta por calor [51].

También en este reporte se demostró que los fagosomas de *Mtb* en macrófagos murinos contienen moléculas de MHC-II, y son el sitio de formación de los complejos péptido Ag 85B- MHC clase II [51].

Grotzke et al, reportaron que los fagosomas son el sitio de formación de los complejos péptido-MHC-I. En este trabajo encontraron dentro del fagosoma proteínas derivadas del proteosoma. Lo que sugiere que el fagosoma se

encuentra íntimamente involucrado en la presentación de antígenos por MHC-I [52].

ANTECEDENTES DIRECTOS

Nuestro grupo previamente ha reportado que los complejos *Mtb* péptido-MHC-II se forman en los fagosomas de línea celular monocítica humana THP-1, mientras que en monocitos derivados a macrófagos humanos (MDM) se forman en los compartimentos de moléculas de clase II (MIIC) y no en fagosomas [53]. Las diferencias que nuestro grupo observó en el procesamiento antigénico pudieran deberse a diferencias intrínsecas entre las células estudiadas o los efectos del IFN- γ utilizado para estimular a las células THP-1. Sin embargo, se desconocen los mecanismos involucrados, incluyendo el papel de las citocinas, en la participación del fagosoma como sitio de formación de complejos péptido-MHC clase II. Previamente, Via et al, demostraron que las citocinas son importantes en la maduración del fagosoma y sugieren que podrían estar involucradas en el procesamiento y presentación a nivel fagosomal [54].

Diversos estudios han demostrado que las citocinas afectan la formación de los complejos péptido-MHC. Por ejemplo, después de la estimulación de células dendríticas con TNF- α , se observaron cambios en la endocitosis así como el ensamblaje de los complejos péptido-MHC a nivel intracelular, lo que sugiere una alteración en el procesamiento antigénico [55]. La activación de macrófagos murinos con IFN- γ induce la acidificación y en consecuencia la maduración de los fagosomas que contienen *Mycobacterium avium* [56]. Por otro lado, se ha descrito

que los fagosomas de células pre-tratadas con IFN- γ contienen niveles elevados de subunidades de proteosoma, MHC-I así como componentes que participan en el ensamblaje de los complejos péptido-MHC-I [57, 58]. En contraste a los efectos estimulatorios del IFN- γ en el sistema inmune, la IL-10 tiene un fuerte efecto inmunosupresor así como actividades anti-inflamatorias. Se ha reportado que la IL-10 disminuye el tráfico y la maduración fagosomal [54]. Además también inhibe el transporte de las moléculas MHC-II sintetizadas *de novo* a la membrana plasmática a través de un proceso post-traducciona l e interfiere con la exocitosis de las MHC-II sintetizadas *de novo* así como el reciclaje de las moléculas MHC-II internalizadas en monocitos humanos [59]. Estas observaciones sugieren que el IFN- γ incrementa el procesamiento y la presentación antigénica mientras que la IL-10 interfiere con el tráfico y la maduración fagosomal. Sin embargo, se desconoce el papel del IFN- γ e IL-10 en el ensamblaje a nivel intracelular de los complejos péptido –MHC-II.

En este trabajo nosotros determinamos los efectos del IFN- γ e IL-10 en la formación y el tráfico intracelular de los complejos péptidos micobacterianos-MHC-clase II en macrófagos humanos infectados con *Mtb* utilizando células TCD4⁺ autólogas.

Justificación

El fagosoma micobacteriano se forma durante la fagocitosis de *Mtb* y es el organelo donde *Mtb* logra sobrevivir, inhibiendo la adquisición de enzimas lisosomales y proteínas importantes para la maduración del fagosoma. Recientemente se ha demostrado que además de ser el fagosoma el organelo donde se lleva a cabo la muerte y degradación bacteriana, es también el sitio donde se forman los complejos *Mtb* péptido-MHCII importantes para la inducción de la respuesta de células T.

Aunque existe información sobre el papel de los fagosomas y compartimentos endosomales en la formación de complejos, el papel de las citocinas importantes en la patogénesis de la tuberculosis como IFN- γ /IL-10 en la cinética del procesamiento de antígenos micobacterianos así como en la formación de los complejos péptidos micobacterianos-MHC-II aún no ha sido bien definido.

Hipótesis: El procesamiento de antígenos micobacterianos en el fagosoma es acelerado por el IFN- γ , mientras que la IL-10 retrasa el proceso.

Objetivo: Estudiar el efecto del IFN- γ e IL-10 en la cinética de procesamiento y la formación de los complejos péptido-MHC clase II en macrófagos derivados de monocitos humanos (MDMs).

Objetivos particulares:

- 1) Determinar las cinéticas del procesamiento y presentación antigénica en MDMs infectadas con *Mtb* viva o muerta por calor.
- 2) Caracterizar por medio de un gradiente de densidad y de forma enzimática a las fracciones subcelulares: fagosomas, fagolisosomas, membrana plasmática y compartimentos de moléculas de clase II.
- 3) Determinar el sitio de formación de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II en las fracciones subcelulares de células THP-1.
- 4) Determinar el sitio de formación de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II en las fracciones subcelulares de MDMs pre-tratadas con IFN- γ .
- 5) Determinar el sitio de formación de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II en las fracciones subcelulares de MDMs pre-tratadas con IL-10.
- 6) Analizar la presencia de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II en organelos intracelulares mediante microscopía de fluorescencia en células MDMs pre-tratadas con IFN- γ e IL-10.

Material y Métodos

Bacteria.

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) cepa H37Ra, obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC#TB127 Manassas, VA, USA), se creció en medio Middlebrook 7H9 (BD Difco, Sparks, MD) suplementado con glicerol al 1% y Middlebrook al 10% de albúmina, dextrosa, catalasa, (BD Difco) durante 21 días. La bacteria se congeló y guardó en alícuotas a -80°C hasta el momento de su uso. El número de bacterias se determinó mediante la cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de agar 7H10 Middlebrook (BD Difco).

Muerte por calor de *Mtb*.

La *Mtb* se incubó a 80°C por 30 min, y la muerte de la micobacteria fue confirmada monitoreando las unidades formadoras de colonias (UFC) en medio 7H10 Middlebrook (BD Difco),.

Preparación de *Mtb* para la infección celular.

Antes de infectar a las células con *Mtb*, la suspensión bacteriana se centrifugó, y para favorecer su disgregación, se pasó 10 veces a través de una aguja del número 27 de espesor (.44 mm) , después se sometió a sonicación a 80 ciclos a 700W, en un sonicador (Ultrasonik 28X NEY, Yucalpa CA) durante 30 segundos. Posteriormente se centrifugó durante 5 min y se tomó el sobrenadante y se diluyó en medio infectante previamente precalentado a 37°C (RPMI suplementado con

suero humano sin inactivar al 10%, sin antibióticos) y se utilizó para la infección celular.

Tinción de *Mtb* con FLUOS

Para los experimentos de la caracterización de fracciones subcelulares fagosomas/fagolisosomas se utilizó a *Mtb* teñida con 5 (6)-Carboxifluoresceína-N-hydroxisuccimida ester (FLUOS). Brevemente, ($1-4 \times 10^9$) bacterias fueron centrifugadas y resuspendidas en 1ml de buffer de fosfatos 20mM (PBS), pH de 9.1 y mezcladas con 25 μ L de dimetil sulfóxido con 20 μ g/ml FLUOS (Boehringer Mannheim, Germany) e incubadas durante 10 min en agitación a temperatura ambiente. La bacteria teñida con FLUOS se lavó tres veces con PBS y antes de usarla para infectar las células se disgregó de acuerdo al procedimiento descrito arriba.

Células y condiciones de cultivo.

A menos que se especifique lo contrario, las condiciones de cultivo celular fueron a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂, en medio de cultivo RPMI 1640 (Bio Whitaker, Walkersville, MD) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Hyclone, Logan, UT), 50mM de 2-mercaptoetanol (2-ME), 1mM de piruvato de sodio, 2mM de L-glutamina, 10mM de HEPES, 100U/ml de penicilina y 100mg/ml de estreptomicina (Bio Whitaker, Walkersville, MD).

La línea celular monocítica humana THP-1 fue obtenida de la American type cultura collection ATCC (# TIB 202). La diferenciación de la línea celular THP-1 a su fase de macrófagos se realizó por cultivo en presencia de 10ng/ml de PMA (Miristato de forbol) (Sigma St. Louis, MO.) durante 24 h posteriormente el medio

de cultivo se removió y las células se incubaron por otras 24 horas con 50U/ml de IFN γ (Endogen, Woburn, MA) .

El hibridoma de células T DB1 específico del péptido 96-111 del antígeno 85B de *Mtb*, fue obtenido de un ratón transgénico DR1 [53] y donado por el Dr. David Canaday de Case Western Reserve University, (Cleveland, Ohio, USA). El hibridoma de células T DB1 fue mantenido en medio de cultivo DMEM (Bio Whitaker, Walkersville, MD) y suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Hyclone, Logan, UT), 50 μ M de 2-mercaptoetanol, 1mM de piruvato de sodio, 2mM de L-glutamina, 10mM de HEPES, 100U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina (Bio Whitaker, Walkersville, MD).

Obtención de monocitos de células mononucleares de sangre periférica.

Posterior a la firma del consentimiento informado se obtuvieron 180ml de sangre periférica de voluntarios sanos con resultado positivo a la prueba intradérmica a la tuberculina (TST), o bien, se obtuvieron paquetes celulares del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Brevemente, 180 ml de sangre heparinizada se diluyeron 1:2 con medio de cultivo RPMI 1640 (Bio Whitaker, Walkersville, MD). Para la separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se adicionó Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo Norway) y se centrifugó a 300 x *g* por 45 min a temperatura ambiente. Con ayuda de una pipeta pasteur se recuperó el anillo celular de la interfase que contiene las PBMC, posteriormente los monocitos se purificaron por adherencia en botellas de cultivo de 75mm³ (Corning NY USA) por 1 h a 37°C. Los monocitos obtenidos se

cultivaron en medio de cultivo RPMI 1640 con suero humano al 10% a 37°C durante 7 días. Después de este tiempo las células adquirieron la morfología de macrófagos y los llamamos células MDMs.

Generación de células T CD4⁺ antígeno-específicas.

A partir de las PBMC se obtuvieron células T CD4⁺ policlonales autólogas de los donadores sanos TST positivos, de acuerdo a lo reportado por Tan y cols [60]. Brevemente, las PBMC (2×10^6 células/pozo) fueron cultivadas [53] en placas de 24 pozos e infectadas con *Mtb* viva a una multiplicidad de infección de 1:10, en medio de cultivo RPMI 1640 con 10% de suero humano y se incubaron durante 10 días a 37°C. Para favorecer la proliferación de las células T se adicionó 50U/ml de IL-2 (Pierce Endogen Biothecnology Rockford, USA) en los días 3, 5 y 7. Después de 10 días de cultivo, las líneas primarias de células T CD4⁺ fueron purificadas por selección positiva utilizando perlas inmunomagnéticas cubiertas de anticuerpo anti-CD4⁺ (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). La pureza de las células T CD4⁺ fue de $96 \pm 2\%$, determinada por citometría de flujo. Posteriormente las células se mantuvieron en reposo por 24h y finalmente se utilizaron para la identificación de los complejos péptido –MHC-II sobre la superficie de los MDM o en las fracciones subcelulares. Para los experimentos donde se utilizó la línea celular THP-1 como células presentadoras de antígeno utilizamos el hibridoma de células T DB1 para la identificación de los péptido (96-111)-MHC-II [61].

Anticuerpos

El anticuerpo anti-Ag85B de conejo fue donado por la Dra. C.I. Espitia-Pinzón (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México). El anticuerpo de ratón anti HLA-DR humano fue obtenido de Caltag (Burlingame, CA, USA); el anticuerpo de ratón anti LAMP-1 fue obtenido de Calbiochem (EMDBiosciences, San Diego, CA, USA), el anticuerpo de cabra anti conejo F(ab')₂ marcado con Alexa Fluor 594 y el anticuerpo de conejo anti _{H+L} ratón marcado con Alexa Fluor 488 fueron elaborados por Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA).

Cinética del procesamiento de *Mtb* y detección de los complejos *Mtb* péptido- MHC-II en MDMs.

Para la diferenciación de monocitos a macrófagos (MDM), los monocitos (1.5×10^5 células/pozo) fueron cultivados en placas de 96 pozos en medio RPMI 1640 al 10% de suero humano durante 7 días a 37°C. Posteriormente (MDMs) los MDMs fueron pre-tratadas con 50U de IFN- γ o con 5ng/ml de IL-10 por 24 h. Seguido de la infección con *Mtb* H37Ra muerta por calor o viva a una multiplicidad de infección de 1:30 (MDM-baterias) durante 1h. Después, las bacterias no fagocitadas se eliminaron por lavados y las células se incubaron en RPMI 1640 a 37°C por intervalos de tiempo de 0, 30, 60 y 120 minutos (cinética de procesamiento antigénico). Las células fueron fijadas con paraformaldeído al 1% en PBS por 20 minutos, y se adicionó un volumen equivalente de lisina 0.4M para evitar el daño celular por el efecto del paraformaldheido. Posteriormente las células fueron lavadas e incubadas con 50,000 células /pozo de TCD4⁺ autólogas

y se incubaron por 24 h. Entonces los sobrenadantes de cultivo se recolectaron y guardaron a -20°C para la posterior determinación de IFN- γ , el cual, es una lectura indirecta del reconocimiento de los complejos de péptidos micobacterianos y las MHC-II presentes en la membrana de las MDMs. La producción de IFN- γ se evaluó por el método de ELISA, utilizando anticuerpos anti IFN- γ (Endogen), y la absorbancia se determinó utilizando un espectrofotómetro Multiskan MCC/340 (Labsystems, Finland), a 405 nm.

Caracterización y aislamiento de las fracciones subcelulares

El aislamiento y caracterización de las fracciones celulares es fundamental para la realización del presente trabajo. Toda la metodología y resultados fueron descritos en el artículo titulado: “***Aislamiento de organelos en macrófagos humanos infectados con Mycobacterium tuberculosis***” (ver anexos). Por esta razón la metodología y resultados publicados en el mencionado artículo se presentará en forma resumida en la sección de resultados.

Detección de complejos *Mtb*-péptido-MHC-II mediante ensayos con células T en las fracciones subcelulares.

La identificación de complejos péptidos *Mtb*-MHC-II, se realizó utilizando células T autólogas. Brevemente las fracciones obtenidas de las MDMs pre-tratadas con 50U de IFN- γ o 5ng/ml de IL-10 por 24 h, fueron congeladas y después descongeladas, para liberar a los complejos *Mtb* -MHC clase II de la membrana de los diferentes organelos subcelulares y de esta manera ser reconocidos por las células T autólogas. Entonces, 50 μ l de cada fracción se incubó en presencia de 1×10^5 células autólogas T CD4⁺ específicas a *Mtb*/pozo. Después de 24 h, se recolectaron los sobrenadantes y se evaluó la producción de IFN- γ por medio de la técnica de ELISA; la absorbancia se determinó utilizando un espectrofotómetro Multiskan MCC/340 (Labsystems, Finland), a 405 nm y los resultados se expresaron en pg/ml.

Detección de complejos *Mtb*-Ag 85B (96-111)-DR1.

Para detectar a los complejos *Mtb* Ag 85B (96-111)-DR1, utilizamos el hibridoma de células T DB1. Brevemente, 50 μ l de cada una de las fracciones subcelulares de células THP-1, se incubaron en presencia de (50×10^3) células/pozo del hibridoma de células T DB1 Después de 24 h, se recolectaron los sobrenadantes y se evaluó la producción de IL-2. La determinación de IL-2 se realizó mediante un ensayo biológico usando a la línea CTLL-2, la cual es dependiente de IL-2 y a la rezarzurina como un indicador de muerte celular. Los resultados se expresaron en

densidad óptica con una longitud de onda 550-595nm, en espectrofotómetro Multiskan MCC/340 (Labsystems, Finland) [61].

Para algunos experimentos en los mismos sobrenadantes, medimos la producción de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ y TNF- α utilizando un kit para detección de citocinas TH1/TH2, Cytokine bead array (CBA) (BD Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la adquisición de cada tubo usamos el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences). Los datos obtenidos fueron analizados utilizando FCAP Array v.1.0.1, (Soft Flow software, Hungary Ltd for CBA BD Biosciences). Los valores de fluorescencia para cada citocina fueron interpolados con su respectiva curva estándar y los resultados se expresaron en pg/ml.

Detección de fagosomas por organelometría de flujo.

Después de realizar el fraccionamiento subcelular, tomamos las fracciones que corresponden a los fagosomas previamente identificadas mediante la detección de la enzima β -hexosaminidasa. Se fijaron mediante la adición de paraformaldehído al 2% y se fijaron por 10 min. Posteriormente se adicionó lisina 0.4M en un buffer de salina fosfatos PBS, y las fracciones se resuspendieron en 0.5ml de PBS. A continuación las fracciones se tiñeron con un anticuerpo anti HLA-DR humano conjugado con PE así como con su control de isotipo inmunoglobulina IgG1 de ratón conjugado con PE (BD Biosciences), en una placa de 96 pozos usando un buffer que contiene saponina para permitir el acceso de los epítopes al lumen. Los organelos fueron fijados y se adquirieron 100,000 eventos en un FACS Calibur® (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los organelos fueron analizados en una

ventana de tamaño vs granularidad usando el programa CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Microscopía de inmunofluorescencia indirecta.

Los MDMs (2×10^6) en suspensión fueron depositados de forma homogénea sobre la superficie de los cubreobjetos redondos de 0.5 cm de diámetro pre-tratados con tri-etoxi-xylene en de las placas de cultivo de 35 mm. Enseguida se permitió su diferenciación durante siete días previos a la adición de los estímulos con 50U/ml de IFN- γ o 5ng/ml de IL-10. Después de 24 h de incubación, las células fueron lavadas con RPMI e infectadas con *Mtb* H37Ra a un MOI 1:30 y se incubaron por 1h. Las bacterias extracelulares fueron removidas y lavadas con RPMI sobre hielo. Se adicionó medio de cultivo y las células fueron incubadas por diferentes periodos de tiempo (0 y 30 minutos). El procesamiento antigénico se detuvo a 4°C y las MDMs se fijaron con paraformaldeído al 2%. Se realizó la incubación con los anticuerpos en presencia y ausencia de saponina 0.1% para la tinción en membrana o intracelular. En el primer paso las células fueron incubadas con los anticuerpos anti- Ag85B y anti-HLA-DR o anti-Ag85B y anti-LAMP1 por 1h a temperatura ambiente, seguido de tres lavados con PBS y 20 min en presencia de suero de conejo no inmunizado. En el segundo paso las células se incubaron con los anticuerpos cabra anti ratón fab'2 Alexa Fluor 594 y conejo anti _{H+L} ratón Alexa Fluor 488 en presencia de suero de conejo. Después de 1h de incubación, las células fueron lavados con PBS y montados en portaobjetos en Mowiol-DAPI (Calbiochem, San Diego, CA, USA, ICN, Biomedicals Inc.) y se examinaron en un

microscopio Olympus BX51 (Tokyo, Japan) equipado con epifluorescencia con un objetivo UPlanAPO 100x [62]

Resultados

Efecto del IFN- γ e IL-10 en la cinética de procesamiento de *Mtb* viva y muerta por calor.

Para conocer los efectos del IFN- γ e IL-10 en el tráfico y procesamiento antigénico de *Mtb* en MDMs, en primer lugar, se determinó la cinética de la presentación antigénica de *Mtb* viva o muerta en células MDMs en presencia o ausencia de citocinas. Nuestros resultados (Figura 1A, 2B) muestran que las células T autólogas producen mayor cantidad de IFN- γ en respuesta a las MDM infectadas con *Mtb* muerta en comparación con *Mtb* viva. También, se observó que tanto las MDM infectadas con *Mtb* muerta como *Mtb* viva, después del pre-tratamiento con IFN- γ inducen la producción temprana de IFN- γ en células T autólogas. En MDMs pre-tratadas con IFN- γ se observaron más rápido en comparación con las MDM no tratadas (30 min). Sin embargo, la producción de IFN- γ por células T autólogas disminuyó más rápidamente en las MDMs tratadas con IFN- γ que en las no tratadas (Figura 1A, 2B).

En contraste al efecto del pre-tratamiento con IFN- γ sobre el procesamiento y la presentación antigénica, en MDM pre-tratadas con IL-10 no observamos producción de IFN- γ hasta los 120 min de procesamiento, tanto en la infección con *Mtb* viva como muerta por calor (Figura 1C, 2D).

También exploramos el efecto de otras citocinas como IL-4 y TNF- α en la cinética del procesamiento micobacteriano. Nosotros encontramos que IL-4 funciona de

manera similar que la IL-10, inhibiendo completamente el procesamiento de *Mtb* tanto viva como muerta por calor (Figura 1G, 2H). En contraste TNF- α inhibe de manera transitoria el procesamiento de *Mtb* muerta por calor, y lo acelera con la *Mtb* viva a los 30 min en la misma forma que con el pre-tratamiento con IFN- γ (Figura 1E, 2F).

Por lo tanto el IFN- γ y TNF- α aceleran el procesamiento y la presentación antigénica después de la infección con *Mtb* viva o muerta, pero la IL-4 e IL-10 inhiben el proceso.

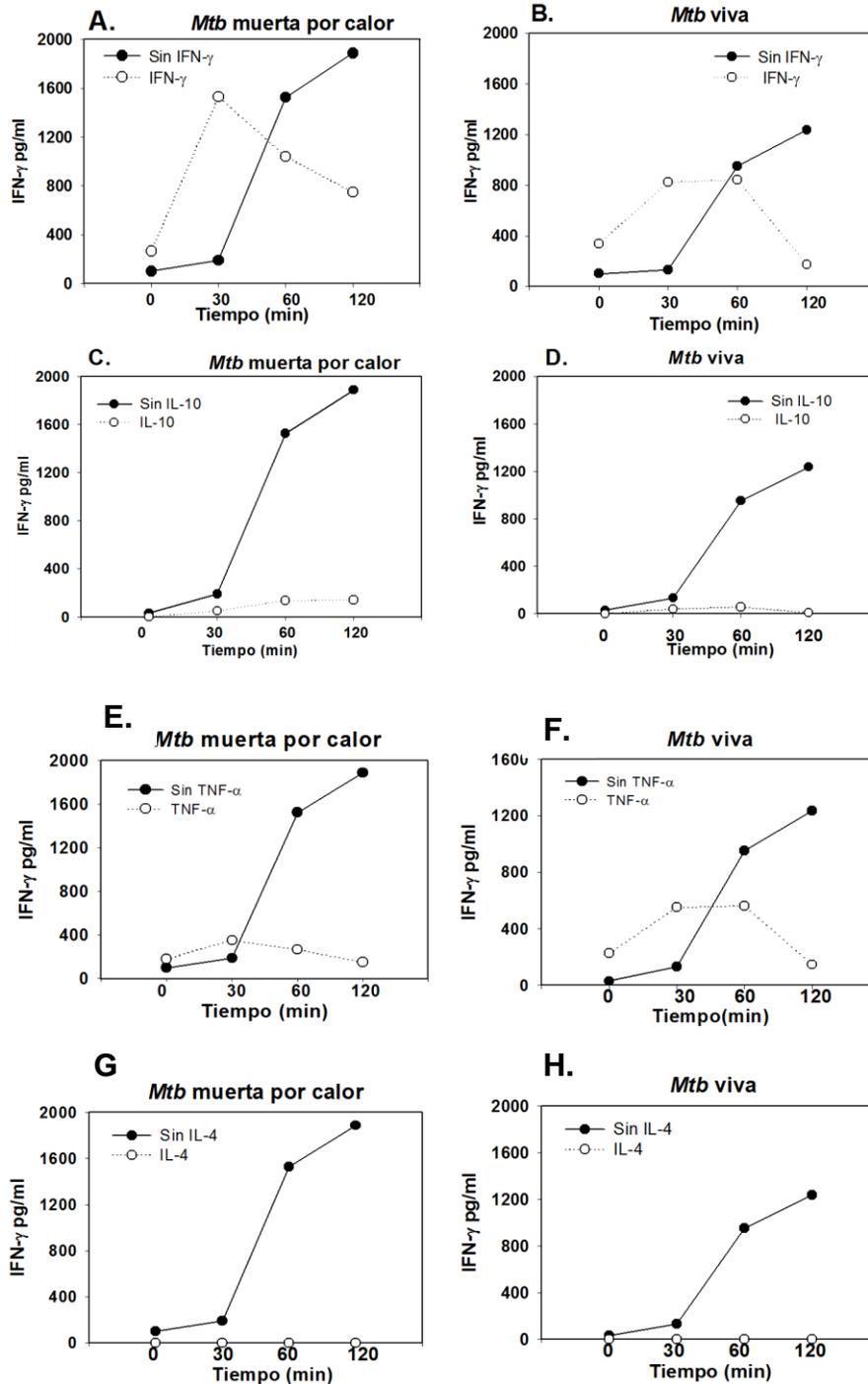


Figura 1. Procesamiento y presentación de antígenos de *Mtb* en MDMs pre-tratados con IFN- γ , IL-10, IL-4 y TNF- α . Los MDMs fueron pre-tratados con 50U/ml de IFN- γ , 5ng/ml de IL-10, 10ng/ml de IL-4 y 10ng/ml de TNF- α durante 24 horas, se lavaron e incubaron con *Mtb* muerta por calor (A,C,E,G) o *Mtb* viva (B,D,F,H) por 60 minutos a una multiplicidad de infección de 30, fueron fijadas y se incubaron después de 30, 60 y 120 minutos. Se usaron células T CD4+ policlonales autólogas las que detectaron a los complejos *Mtb* péptido-MHC-II, y se midió en los sobrenadantes los niveles de IFN- γ por el método de ELISA. Datos representativos de 4 experimentos independientes.

Fraccionamiento subcelular y caracterización de células MDMs incubadas con *M. tuberculosis*.

Después de determinar la cinética y el efecto del IFN- γ y de la IL-10 sobre la expresión de complejos *Mtb* péptido-MHC-II en la superficie celular de MDM, procedimos a evaluar el efecto de estas citocinas sobre la distribución de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II en los organelos subcelulares importantes en el procesamiento antigénico como lo son; membrana, endosomas y fagosomas, para lo cual, se realizó la separación de los organelos subcelulares utilizando la técnica de ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa con 27% de percoll. La caracterización de las fracciones celulares fue descrita en el artículo titulado: “*Aislamiento de organelos en macrófagos humanos infectados con Mycobacterium tuberculosis*” (ver anexos). A continuación se presenta de forma breve el fundamento de la separación, metodología y los resultados de la caracterización de las fracciones subcelulares.

El desarrollo de técnicas de fraccionamiento celular es un medio para lograr el análisis de la composición y propiedades de elementos subcelulares purificados. El fraccionamiento subcelular es esencial para el desarrollo de ensayos “libres de células”.

Existen dos métodos de fraccionamiento celular, el primero es la centrifugación diferencial; y el segundo, la centrifugación por gradiente de densidad. En el presente trabajo utilizamos la centrifugación por gradiente de densidad que tiene la capacidad de combinar la velocidad de sedimentación con un gradiente de

densidad como la sacarosa y la sílica coloidal llamada Percoll. Este reactivo está compuesto por partículas cubiertas de sílica polivinilpirrolidona de 20 nm, el rango del gradiente va de 1.0-1.3 g/ml lo cual depende del tiempo y la velocidad del centrifugado, así como de la concentración de sacarosa. El Percoll, por sí mismo, tiene un efecto estabilizador en las membranas de los organelos, lo que mantiene su actividad enzimática [63].

En nuestro grupo nos hemos enfocado a la separación de compartimentos subcelulares con el objeto de buscar formas funcionales de moléculas de clase II utilizando gradientes de densidad. En este trabajo usamos la técnica de ultracentrifugación utilizando un gradiente de Percoll al 27% para la purificación de fracciones subcelulares, como fagosomas, fagolisosomas, y membrana plasmática de macrófagos humanos infectados con *Mtb*.

Previo a la ultracentrifugación fue necesario llevar a cabo la infección con Mtb y posteriormente realizar un proceso de homogenización.

a) Infección con Mtb

Los MDM se incubaron con *Mtb* muerta por calor a una multiplicidad de infección (MOI) de 1:30, por 1h, seguido de diferentes tiempos de procesamiento (0, 30 y 60 minutos).

b) Homogenización

Posteriormente, las células fueron lavadas con medio RPMI, despegadas con un rastrillo de células y resuspendidas en 1ml de buffer de homogenización (Sacarosa 0.25M, y 10mM de HEPES pH 7.2). Las células se homogenizaron a través de un homogenizador de cristal (Dounce) en forma mecánica, y el

porcentaje de lisis celular se determinó utilizando el colorante de viabilidad azul de tripano. La homogenización se realizó hasta alcanzar un 60 a 70% de lisis y para eliminar las células intactas y núcleos, se centrifugó a 200 g por 10 min a 4°C.

c) Ultracentrifugación y fraccionamiento

El homogenizado celular se centrifugó sobre una solución de Percoll (Pharmacia, Uppsala Swedden) al 27% a 28,000 g a 4°C durante 1 h (Sorvall RC-100). El gradiente de Percoll se fraccionó de forma manual en 30 fracciones de 333µl cada una, desde la parte superior al fondo del tubo, en un rango de densidad de 1.037 a 1.107. El gradiente de densidad se determinó en paralelo a la centrifugación, agregado un tubo con Percoll al 27% y perlas de densidad marcadas (Density Marker Beads, Amersham Biosciences, Uppsala Sweden). Utilizando estas condiciones se separaron fracciones subcelulares de densidad baja correspondiente a membrana (1.040 g/ml) compartimentos endosomales (1.071 g/ml) y de alta densidad como fagosomas- lisosomas (1.109 g/ml) (Figura 2).

Nuestros resultados muestran que las fracciones 10 a 14 estaban en una región de baja densidad en el gradiente de Percoll al 27%, lo que corresponde a membrana plasmática de acuerdo con la densidad de 1.040 g/ml (Figura 2). Las siguientes fracciones que analizamos de acuerdo con su densidad fueron de la 22 a la 29, las cuales están en una región de alta densidad, donde se localizan los fagolisosomas con una densidad de 1.109 g/ml (Figura 2). También analizamos otras fracciones, como las que van de la 15-20 que de acuerdo con su densidad corresponden a compartimentos endosomales, con una densidad de 1.071 g/ml.

Para tener una mejor calidad de nuestra caracterización, corroboramos los resultados de densidad, haciendo una caracterización enzimática.

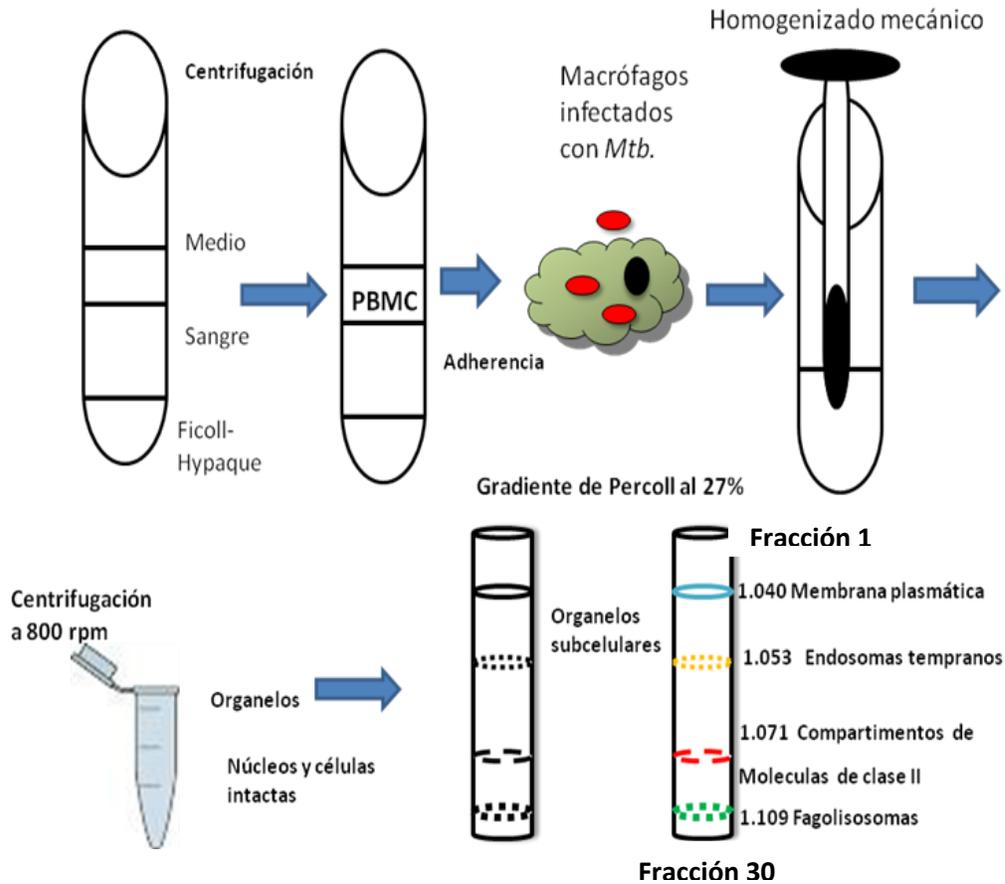


Figura 2. Técnica de purificación de monocitos y aislamiento de organelos mediante gradiente de densidad. Purificación de monocitos de sangre periférica utilizando Ficoll-Hypaque como gradiente de densidad y centrifugación diferencial. Los monocitos obtenidos se adherieron por 7 días hasta obtener macrófagos. Los macrófagos fueron infectados con *Mtb* y se realizó homogenización mecánica para poder liberar a los organelos. Se colocaron sobre un gradiente de densidad con Percoll al 27% y mediante ultracentrifugación se aislaron los organelos.

Caracterización de las fracciones subcelulares

a) Fagolisosomas

La caracterización de las fracciones fagolisosomales se realizó mediante la detección de la enzima β -hexosaminidasa. Brevemente, 50 μ l de cada una de las fracciones fueron incubadas con 150 μ l de buffer de reacción, el cual contiene 0.1M de ácido morfolinetanesulfónico (MES), 0.2% de Tritón X-100, pH 6.5 y 50 ml de p nitrofenil-acetil-b-D-glucosaminida. Después de 90 min a 37°C fue parada la reacción con un buffer con glicina 0.5M, pH 10. La densidad óptica se determinó a 405 nm. Los resultados muestran la distribución de la enzima lisosomal β -hexosaminidasa en las fracciones 23-29 en una región de densidad alta en el gradiente de Percoll al 27% (Figura 3B). Los fagolisosomas también fueron caracterizados mediante la detección de *Mtb*-fluos. Brevemente, las fracciones obtenidas de un ensayo en el cual se infectó con *Mtb*-Fluos fueron analizadas por fluorimetría utilizando un fluorómetro (405 nm, Fluoroscán Ascent FL labsistem). Los resultados muestran la presencia de *Mtb*-FLUOS en las fracciones 22 a la 29 en una región de densidad alta en el gradiente de Percoll al 27%, coincidiendo con la densidad de los fagosomas y con las fracciones donde detectamos a la enzima fagolisosomal β -hexosaminidasa (Figura 3A).

b) Membrana Plasmática

Para identificar las fracciones que contenían membrana plasmática, previo a la homogenización celular, la membrana plasmática se marco con 0.5 mg/ml sulfa-NHSLC- biotina (Pierce, Rockford, Il) y 10 mg/ml de estreptavidina-FITC (BD Bioscience, San Diego, CA). La fluorescencia en cada una de las fracciones se

determinó mediante fluorometría (Fluoroscán Ascent FL labsistem) a 405 nm y los resultados fueron expresados en unidades de fluorescencia. La fluorescencia asociada a la membrana plasmática se observó en las fracciones 10 a 14 en una región de baja densidad en el gradiente de Percoll al 27%, coincidiendo con la densidad de la membrana plasmática de 1.040 g/ml.(Figura 3C).

c) Compartimentos de moléculas de clase II

Para identificar a los MIIC, las células MDMs se incubaron con antígeno de 85B de *Mtb* soluble por 1 h antes del homogenizado y fraccionamiento. La presencia de los complejos *Mtb* 85B (96-111)- CD4⁺ se detectó mediante los ensayos de células T. Los complejos *Mtb* Ag 85 B (96-111)-DR1 se detectaron en las fracciones 18-25. Como conclusión los fagosomas, membrana plasmática y MIIC se aislaron mediante la técnica de ultracentrifugación sobre un gradiente 27% Percoll, lo que nos permitió estudiar el procesamiento de *Mtb* a nivel intracelular (Figura 3D).

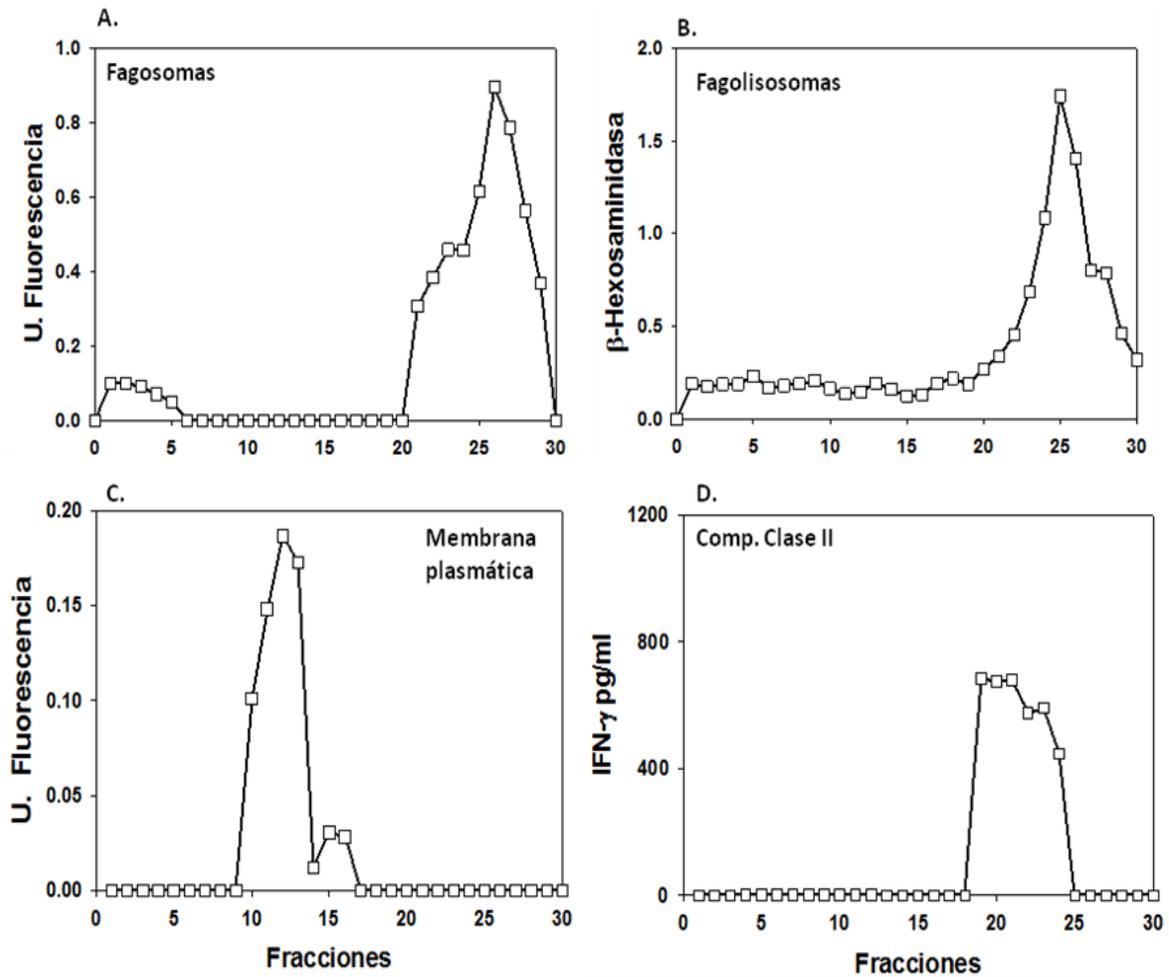


Figura 3. Caracterización de fracciones subcelulares de macrófagos purificados sobre gradiente de Percoll al 27%. A y B) Las fracciones fagosomas/fagolisomas se identificaron incubando con *Mtb* marcada con fluoresceína y se analizó la fluorescencia en cada una de las fracciones, y la actividad de la enzima lisosomal β -hexosaminidasa. **C)** Las fracciones de membrana plasmática se detectaron por la tinción en los MDMs con sulfo-NHS-LC-biotin/estreptavidina-fluoresceína. Las fracciones se analizaron un fluorómetro. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de fluorescencia. **D)** Las fracciones que contienen compartimentos de clase II MIIC se identificaron incubando los MDMs con Ag85B soluble y medimos la presencia de los complejos *Mtb* Ag85B usando células T CD4+ autólogas.

El pretratamiento con IFN- γ favorece la presencia de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II en las fracciones que contienen fagosomas.

En este estudio evaluamos el efecto del pre-tratamiento con IFN- γ sobre el sitio de formación de los complejos *Mtb*-péptido-MHC-II para lo cual, las células THP-1 y las MDMs fueron pre-incubadas con IFN- γ previo a la infección con *Mtb* muerta por calor y fraccionadas como se describió previamente. Las fracciones subcelulares se sometieron a varios ciclos de congelación - descongelación con el objeto de liberar el contenido de las fracciones subcelulares. Enseguida se realizaron los ensayos funcionales para localizar los complejos *Mtb* péptido-MHC-II en las fracciones subcelulares utilizando las células T autólogas o el hibridoma de células T DB1 específico para el Ag 85B (96-111)-DR1.

Nuestros resultados muestran que en los MDMs pre-tratados con IFN- γ los complejos *Mtb* péptido-MHC-II se detectaron en las fracciones correspondientes a los fagosomas (fracciones 25 a 29) al tiempo 0 (Figura 4A). En contraste, en los MDMs sin tratamiento, se detectaron en los MIIC al tiempo 0 (fracciones 16 a 24) (Figura 4A). En las células THP-1 los complejos Ag 85B (96-111)-DR1 también se detectaron en fagosomas (fracciones 25 a 29) (Figura 4D). Después de 30 minutos de procesamiento detectamos a los complejos *Mtb* péptido-MHC-II de MDMs pre-tratados con IFN- γ , en las fracciones fagosomales (fracciones 25 a 29) y en fracciones de membrana plasmática (fracciones 6 a 12), en las MDMs no tratadas los complejos se observaron en las fracciones de compartimentos MIIC (fracciones 17 a 24) (Figura 4B). En las células THP-1 en este mismo tiempo, los complejos

Ag 85B (96-111)-DR1 se detectaron en las fracciones de fagosomas, MIIC y membrana plasmática (fracciones 25 a 29, 20 a 24, y 9 a 12 respectivamente). Cuando aumentamos el tiempo de procesamiento a 60 minutos, en MDMs pre-tratados con IFN- γ , los complejos *Mtb* péptido-MHC-II se encontraron en fracciones de MIIC y en fracciones de membrana plasmática y no en fagosomas como en los tiempos previos. Por otro lado en los MDMs sin pre-tratar se detectaron los complejos *Mtb* péptido-MHC-II en fracciones de fagosomas y en fracciones de membrana plasmática. (Figura 4C). Después de 60 min de procesamiento en células THP-1 los complejos Ag 85B (96-111)-DR1 se localizaron en fracciones de membrana plasmática (fracciones 8 a 12) (Figura 4F). Estos resultados indican que tanto en las células MDMs pre-tratadas con IFN- γ como en las THP-1 los complejos *Mtb* péptido-MHC-II se detectaron inicialmente en fagosomas, mientras que en los MDM no tratados los complejos fueron detectados inicialmente en MIIC. Lo que sugiere que el IFN- γ acelera el procesamiento y la presentación de *Mtb* alterando el sitio de formación de los complejos péptido-MHC-II así como el tráfico a compartimentos intracelulares.

Por otra parte, para descartar que pudiera existir alguna interferencia del IFN- γ usado en el pre-tratamiento de las MDMs, en la producción de IFN- γ (pg/ml) proveniente del reconocimiento de las células T autólogas a los complejos *Mtb* péptidos-MHC-II, también medimos la producción de otras citocinas como IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ usando ensayos de CBA (Citokine bead array). Nuestros resultados muestran que células TCD4+ policlonales autólogas específicas a *Mtb*

producen altos niveles de IFN- γ en las fracciones que corresponden a fagosomas (22 a 29) y sólo bajos niveles de IL-2 y TNF- α en las mismas fracciones. Con estos experimentos nos aseguramos que el IFN- γ fue producido por estimulación específica y no por la contaminación del IFN- γ usado para el pre-tratamiento de las MDMs (Figura 5).

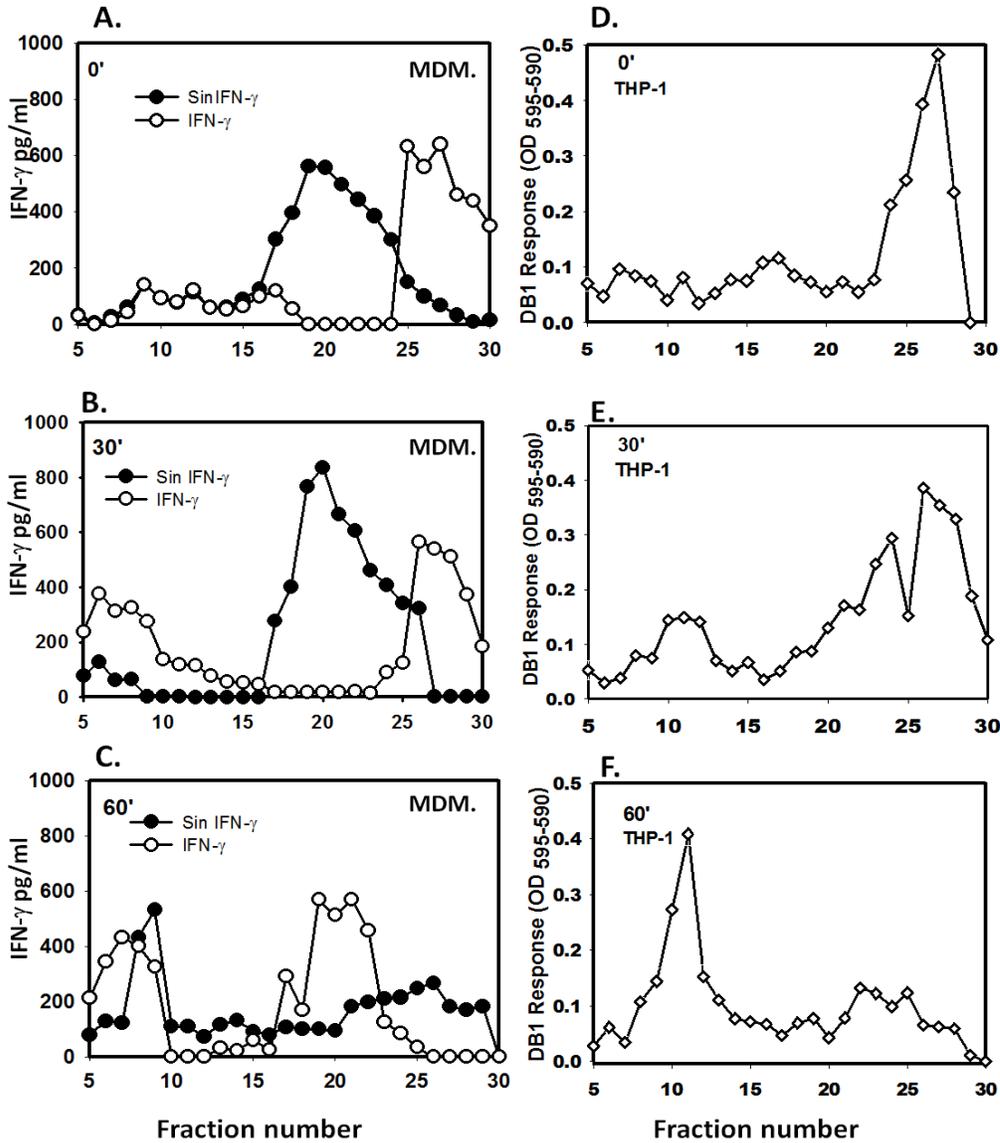


Figura 4. Complejos *Mtb* péptido-MHC-II son detectados por líneas células T específicas a *Mtb* en fagosomas de MDMs tratados con IFN- γ y complejos Ag85B (96-111)-DR1 en fagosomas de THP-1 detectados por medio de un hibridoma específico DB1. Los MDMs se pre-trataron con 50 U/IFN- γ y fueron infectados con *Mtb* por una hora, lavados e incubados por 0 (A), 30 (B), y 60 (C) minutos, antes de la homogenización. Los organelos subcelulares fueron separados en un gradiente de Percoll al 27% y los complejos fueron detectados usando células T CD4+ específicas a *Mtb*. Los resultados se expresaron en pg/ml de IFN- γ . Las células THP-1 fueron incubadas con *Mtb* por una hora, lavadas e incubadas por 0 (D), 30 (E) y 60 (F) minutos. Los complejos *Mtb* Ag85B (96-111)-DR1 fueron detectados usando un hibridoma de células T DB1. A los sobrenadantes se les midió la producción de IL-2 mediante un ensayo de proliferación utilizando la línea celular CTLL-2. Símbolos abiertos corresponden a los experimentos pre-tratados con IFN- γ y los símbolos cerrados sin pre-tratar. Datos correspondientes a 4 experimentos independientes.

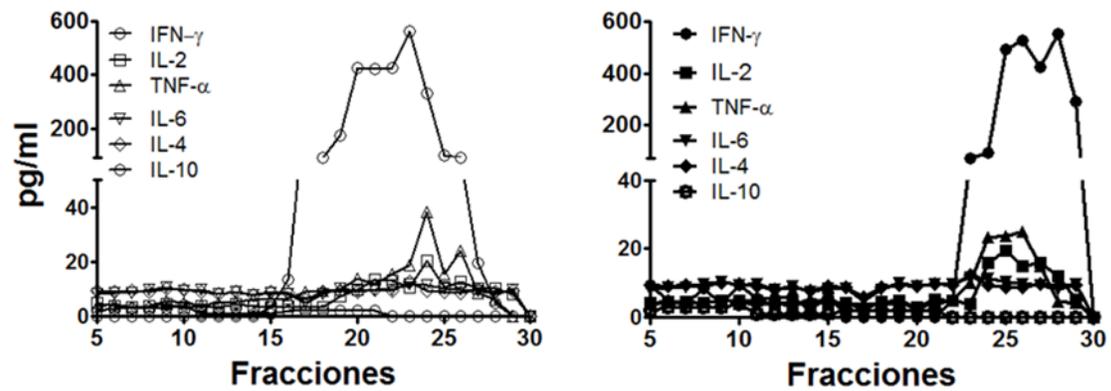


Figura 5. Producción de citocinas en respuesta al reconocimiento de las células T CD4⁺ autólogas a los complejos *Mtb*-MHC-II. Se detectó la producción de IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-6, IL-4 e IL-10 en cada una de las fracciones subcelulares de MDMs pre-tratadas con IFN- γ (panel izquierdo), y sin pre-tratar (panel derecho). Se utilizó un kit de CBA para citometría de flujo.

El IFN- γ incrementa la llegada de las moléculas de clase II y disminuye la actividad de la β -Hexosaminidas en los fagosomas.

Previamente se reportó que los fagosomas de células pre-tratadas con IFN- γ contienen niveles elevados de sub unidades de proteosoma, MHC-II así como componentes que se requieren para la formación de los complejos péptido-MHC-II [57, 58]. Por lo que, evaluamos el efecto del IFN- γ en la actividad enzimática de la β -Hexosaminidasa así como en la adquisición de MHC-II en los fagosomas (fracciones 22-29). Como se muestra en la figura 6A la actividad de la β -Hexosaminidasa se encuentra disminuida ($p < 0.05$) en los fagosomas de MDMs pre-tratados con IFN- γ , y observamos el mismo efecto en los MDMs pre-tratadas con IL-10, sin embargo tal efecto no fue estadísticamente significativo.

En los fagosomas de *Mtb* aislados de MDMs pre-tratados con IFN- γ , observamos que el porcentaje de MHC-II fue mayor que en los fagosomas de MDMs sin pre-tratar (30.65% vs 5.22% de dobles positivos respectivamente) (Figura 6B). Observamos el mismo efecto con el valor de intensidad media de fluorescencia (MFV) (6.22 vs 3.18 respectivamente, Figura 6B).

Estos resultados nos indican que el IFN- γ incrementa la llegada de moléculas MHC-II al fagosoma, pero limita la adquisición de la enzima β -Hexosaminidasa, lo que sugiere que esta enzima degrada a *Mtb* y el fagosoma contiene moléculas del MHC-II para la formación de complejos.

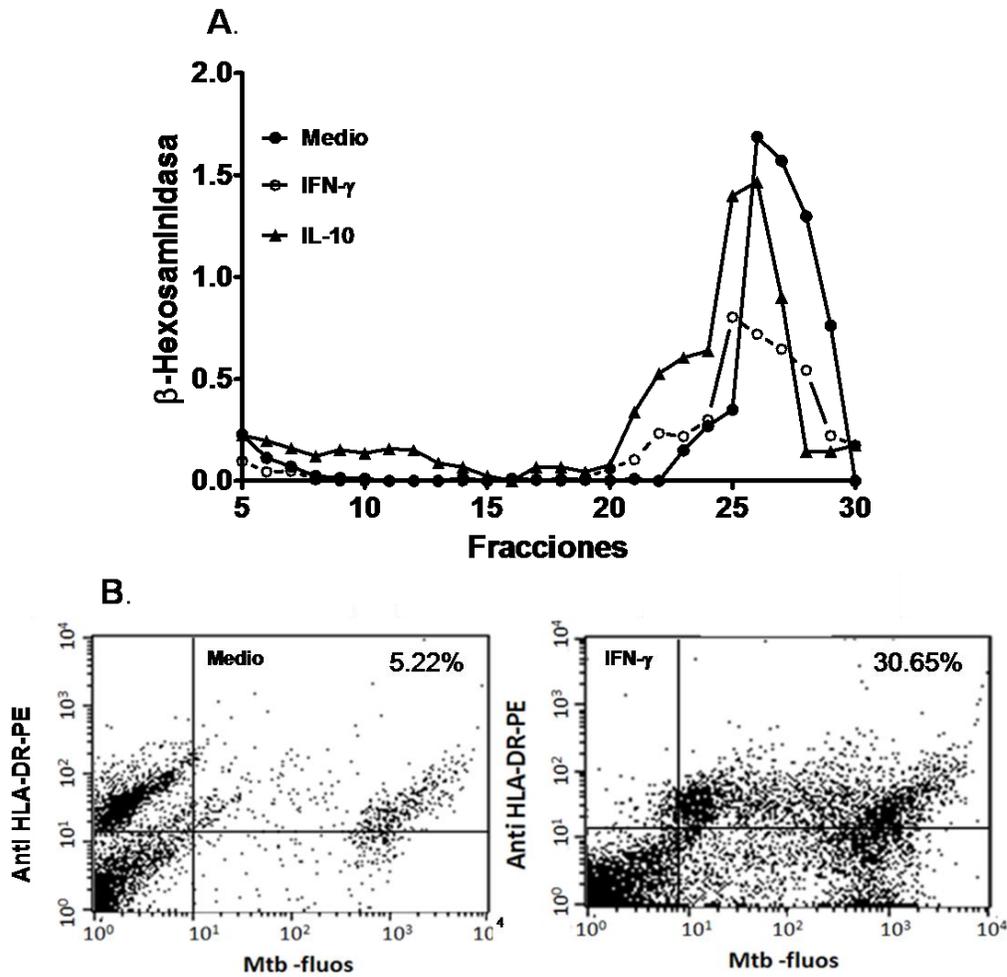


Figura 6. Distribución de la actividad de la enzima β -hexosaminidasa y MHC-II en fracciones subcelulares de MDMs pre-tratados con IFN- γ . **A)** Las MDMs fueron pre-tratadas con (círculos abiertos) y sin (círculos cerrados), 50U/ml de IFN- γ o con (triángulos cerrados) 5ng/ml de IL-10 antes de la infección con *Mtb*. Mediante un ensayo colorimétrico en cada una de las fracciones se midió la actividad de la β -hexosaminidasa, los resultados se expresaron en unidades de fluorescencia (DO 405). **B)** Las MDMs se pre-trataron con 50U/ml de IFN- γ y se incubaron con *Mtb* teñida con FLUOS. Posteriormente se purificaron los fagosomas mediante gradientes de Percoll al 27% se fijaron y se realizó tinción con PE anti-HLA-DR y se realizó organelometría de flujo. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

Los complejos *Mtb* péptido-MHC-II se localizan en los MIIC de MDM pre-tratados con IL-10.

Posteriormente, estudiamos el efecto de la IL-10 en la formación de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II en las fracciones subcelulares de MDMs infectados con *Mtb* utilizando células T autólogas específicas para antígenos micobacterianos. Como se observa en la figura 8, inmediatamente después de la infección (tiempo 0) y a los 30 min de procesamiento, los complejos *Mtb* péptido-MHC-II se detectaron en las fracciones de MIIC (fracciones 17 a 24) en las células sin pre-tratar, así como en las pre-tratadas con IL-10 (fracciones 16 a 23) (Figura 7A). Sin embargo en las MDMs sin pre-tratamiento los complejos *Mtb* péptido-MHC-II se observaron en fracciones de membrana plasmática, mientras que en los MDMs pre-tratadas con IL-10 los complejos permanecen en las fracciones de los MIIC aún después de los 60 min de procesamiento (Figura 7B, C). Estos resultados sugieren que la IL-10 retiene a los complejos *Mtb* péptido-MHC-II en los MIIC.

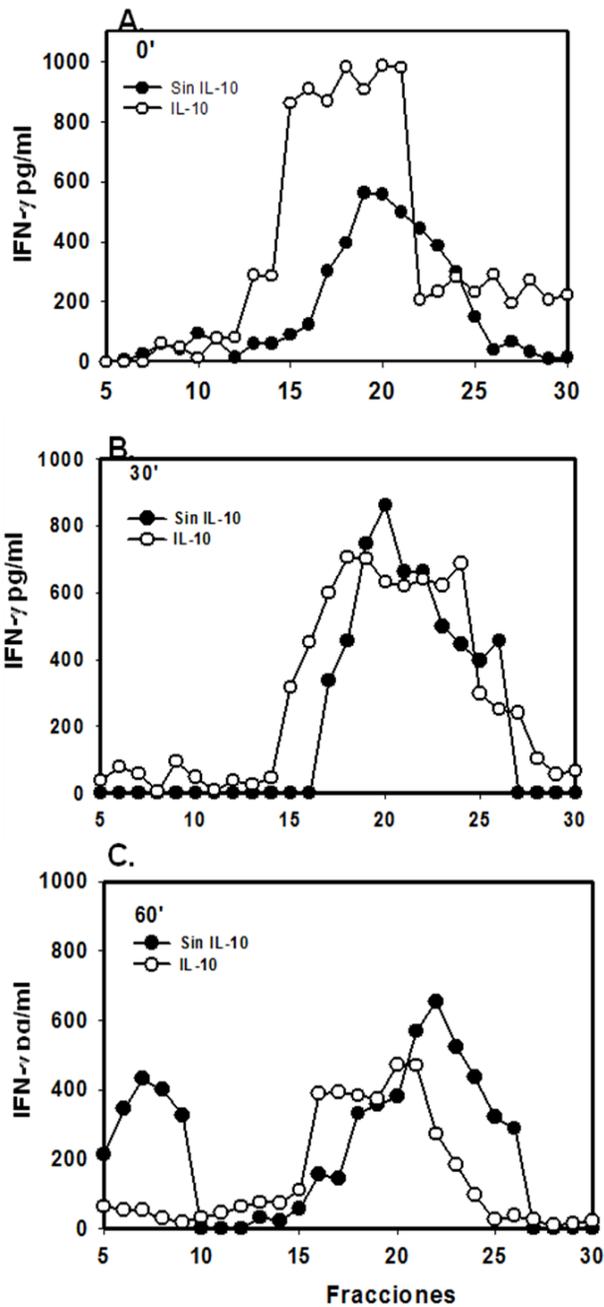


Figura 7. La IL-10 retiene a los complejos *Mtb* péptido-MHC-II en compartimentos de moléculas de clase II. Las MDMs fueron pre-tratadas con 5ng/ml de IL-10 y fueron incubadas con *Mtb* por una hora, lavadas e incubadas por 0 (A), 30 (B) y 60 (C) minutos antes de la homogenización. Los organelos subcelulares se obtuvieron por gradientes de Percoll al 27%. Los complejos *Mtb* péptido-MHC-II se detectaron usando células T CD4+ autólogas específicas para *Mtb*, se midió la producción de IFN- γ por ELISA. Estos datos son representativos de 3 experimentos independientes.

El Ag-85B y HLA-DR colocalizan en la membrana celular y vesículas intracelulares de MDM pre-tratadas con IFN- γ .

A continuación usamos microscopía de inmunofluorescencia para poder seguir la localización intracelular del antígeno micobacteriano (Ag 85B) en MDMs pre-tratadas con IFN- γ , IL-10 y en MDMs infectadas con *Mtb*. Nuestros resultados mostraron inmediatamente posterior a la infección (tiempo 0) no fue posible detectar la presencia del Ag85B asociado con las moléculas HLA-DR en la membrana celular en ninguna de las condiciones estudiadas. En contraste, en las MDMs pre-tratados con IFN- γ a los 30 minutos de procesamiento, observamos la presencia del Ag85B asociado con las moléculas HLA-DR en la membrana celular. Esta asociación fue observada en color amarillo lo que indica la colocalización del antígeno con las moléculas HLA-DR (Figura 8A arriba). Observamos en la membrana de vesículas intracelulares, al Ag 85B asociado a las moléculas HLA-DR tanto en MDMs pre--tratados con IFN- γ o IL-10. La intensidad del color amarillo se incrementó de la condición de 0 a 30 min de procesamiento (Figura 8A abajo). Después de observar el incremento de los complejos Ag85B-HLA-DR investigamos la naturaleza de los compartimentos intracelulares en donde se localizaban estos complejos. Como se muestra en la figura 8B, en las MDMs pre-tratados con IFN- γ detectamos al antígeno 85B en vesículas con un diámetro de 1 a 3 μ m las cuales fueron positivas para LAMP-1, un marcador de vesículas lisosomales/endosomales. Estos compartimentos se encuentran involucrados en el procesamiento antigénico así como en el transporte de péptidos a la membrana celular. En contraste a lo

observado con las células pre-tratadas con IFN- γ , en las células pre-tratadas con IL-10 observamos tinciones independientes para Ag85B y LAMP-1 en vesículas lisosomales, sin embargo la asociación fue débil o nula (Figura 8B abajo). Los resultados de microscopia de inmunofluorescencia son una evidencia que apoya a nuestros resultados del fraccionamiento subcelular, lo que sugiere que el IFN- γ acelera el procesamiento antigénico de *Mtb* y su presentación a la membrana celular, mientras que la IL-10 favorece el tráfico del Ag85B a vesículas que no contienen LAMP-1.

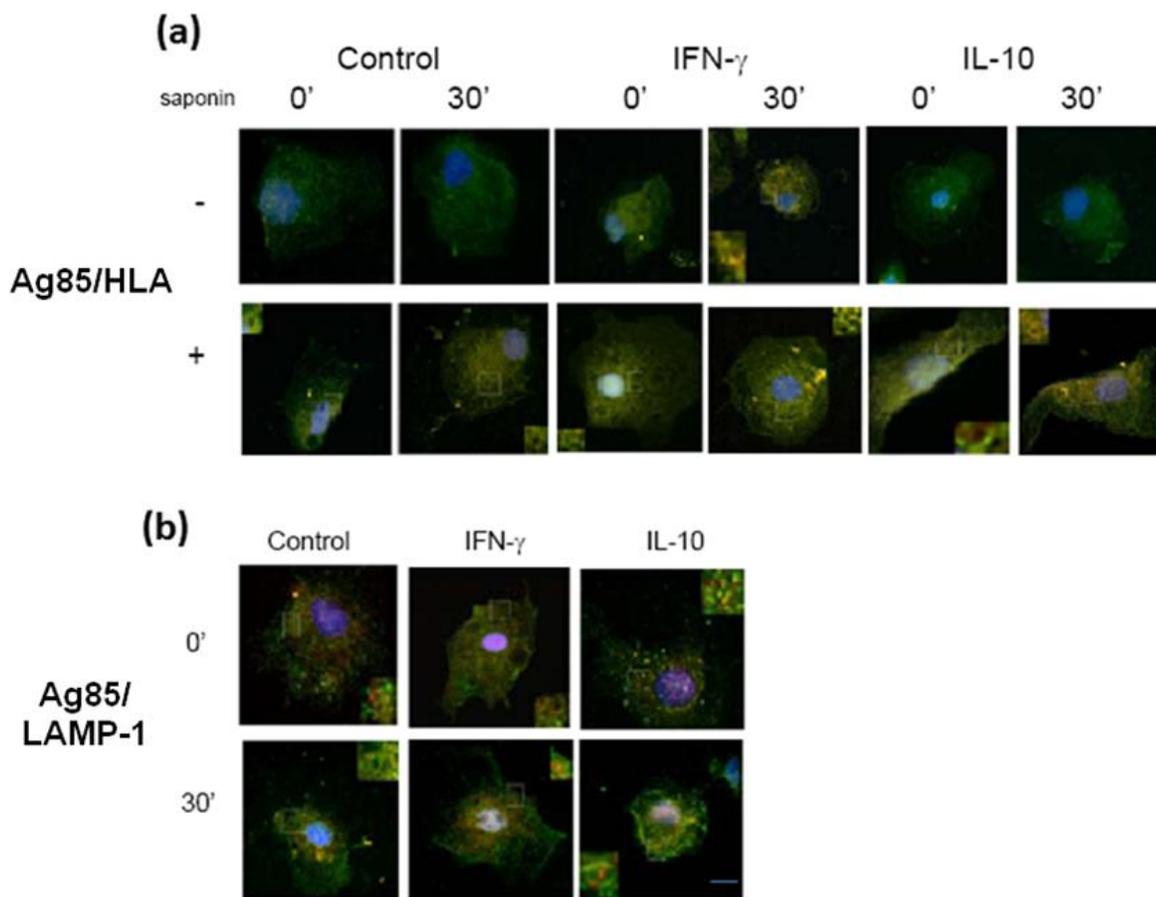


Figura 8. El pre-tratamiento con IFN- γ e IL-10 tiene diferentes efectos en el acceso de los complejos Ag 85B/HLA-DR1 en membrana y vesículas intracelulares. Las MDMs fueron pre-tratadas con IFN- γ o IL-10 por 24 horas, se infectaron con *Mtb* y se incubaron a los 0 y 30 minutos, posteriormente se realizó una doble tinción. **A)** Con anti HLA-DR (verde) y anti 85B (rojo) en presencia (arriba) o ausencia (abajo) de saponina. **B)** Con anti Ag 85B (rojo) y anti LAMP-1 (verde) en presencia de saponina. La colocalización se observa en amarillo. Los núcleos se tiñeron con DAPI. La barra es igual a 20 μ m.

DISCUSIÓN

En este trabajo demostramos que el pre-tratamiento con IFN- γ a las células MDMs acelera el procesamiento antigénico de *Mtb* así como la presentación antigénica, esto de acuerdo al incremento y la detección temprana de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II en los fagosomas y en la membrana plasmática de las MDMs. En contraste, la IL-10 disminuye la presentación antigénica de *Mtb*, a nivel de membrana plasmática y retiene los complejos *Mtb* péptido-MHC-II en los compartimentos de las moléculas de clase II (MIIC).

El papel crucial del IFN- γ en la patogénesis de la tuberculosis ha sido ampliamente estudiado y se ha descrito en modelos animales. El IFN- γ incrementa la actividad micobactericida, induciendo la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS), permitiendo la producción de óxido nítrico [64] esto ha sido bien demostrado en el modelo murino [65]. En el hombre se ha descrito que mutaciones en genes que se encargan de controlar el eje IL-12/IL-23, el cual es dependiente de la producción de IFN- γ , incrementa la susceptibilidad a infecciones micobacterianas [66, 67]. Sin embargo, el papel del IFN- γ en el procesamiento antigénico y la presentación de *Mtb* por los macrófagos han sido pobremente estudiadas a nivel subcelular. En particular, poco se sabe acerca de cómo las citocinas prototípicas de la respuesta TH1/TH2, IFN- γ e IL-10, afectan el sitio de formación y el tráfico de los complejos péptido MHC-II en macrófagos humanos.

En nuestro estudio observamos que el IFN- γ incrementa el procesamiento de *Mtb* tanto viva como muerta por calor, lo que indica que este efecto no depende de la viabilidad micobacteriana. El incremento del procesamiento de *Mtb* tanto viva como muerta por calor en presencia de IFN- γ en MDMs podría deberse a la activación inducida por el IFN- γ , y de esta forma aumentar el procesamiento antigénico y promover la carga antigénica a las moléculas del MHC-II [54, 57, 68]. Sin embargo el número de complejos péptido-MHC-II en la superficie celular después de 60 y 120 minutos disminuye en las MDMs pre-tratadas con IFN- γ , lo que sugiere que el pre-tratamiento con IFN- γ debe de inducir mecanismos que promueven la degradación y el reciclaje de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II, resultando en una breve presentación del antígeno en la membrana plasmática.

También demostramos que nuestro modelo de MDMs como células presentadoras de antígeno y líneas de células T autólogas estimuladas con *Mtb*, sirven para detectar a los complejos *Mtb* péptido-MHC-II de una forma similar a lo que demostramos previamente en las células THP-1 y el hibridoma de células T DB1. Este modelo experimental junto con el fraccionamiento subcelular puede ser usado como seguimiento de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II, como lo mostramos en este trabajo.

Desmostramos que en MDMs pre-tratadas con IFN- γ los complejos *Mtb* péptido-MHC-II aparecen en fagosomas de manera temprana (tiempo 0), mientras que en MDMs sin pre-tratar los complejos se detectaron en los MIIC. Estos resultados correlacionan con los niveles altos de moléculas de MHC-II (HLA-DR) en

fagosomas de MDMs pre-tratados con IFN- γ . Nosotros sugerimos que las moléculas de MHC-II se concentran en los fagosomas de las MDMs pre-tratadas con IFN- γ , permitiendo que los complejos *Mtb* péptido-MHC-II sean formados en dichos compartimentos. De acuerdo con esto, se ha reportado que en células tumorales presentadoras de antígeno, el IFN- γ induce la expresión de HLA-DM, HLA-DR, cadena invariante (Ii), y la proteasa cathepsina S (la cual es necesaria para la degradación de la cadena invariante), quedando las moléculas del MHC disponibles para acoplar péptidos antigénicos [69]. Basados en estos datos y en nuestros resultados, sugerimos que el IFN- γ provee a los fagosomas con las moléculas necesarias para ensamblar a los complejos *Mtb* péptido-MHC-II. Además de los efectos ya conocidos del IFN- γ en el aumento de la actividad micobactericida en los macrófagos [48, 70, 71] proponemos un papel biológico adicional: el IFN- γ tiene la capacidad de preparar al fagosoma para ensamblar a los complejos *Mtb* péptido-MHC-II.

En seguida investigamos si el pre-tratamiento con IFN- γ en los MDMs podría alterar la adquisición fagosomal de la enzima lisosomal β -hexosaminidasa. La adquisición de las enzimas lisosomales es un marcador de maduración fagosomal y son necesarias para el procesamiento antigénico [72]. Previamente Yates y colaboradores reportaron que la activación de macrófagos con IFN- γ reduce la actividad de las proteasas y previene la destrucción proteolítica completa de proteínas y péptidos pero favorece la generación de péptidos para la presentación antigénica [73, 74]. Nosotros encontramos que en los MDMs pre-tratados con IFN- γ

se reduce la actividad de la enzima β -hexosaminidasa en los fagosomas, como anteriormente se había reportado [51]. A pesar de la reducción de la enzima, observamos que en los MDMs pre-tratados con IFN- γ , se aumentó el procesamiento y la presentación antigénica. Por lo tanto sugerimos que hay una fina regulación de la adquisición de enzimas lisosomales combinado con una actividad proteolítica moderada, lo cual es necesario para un ensamblaje óptimo de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II en fagosomas humanos.

Otra observación importante de nuestro trabajo es que el pre-tratamiento con IFN- γ induce un ensamblaje de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II en fagosomas y que esos complejos fueron detectados de manera temprana en la membrana plasmática en comparación a los MDMs no pre-tratados. Estos resultados sugieren que el IFN- γ promueve un tráfico eficiente de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II a la membrana plasmática para activar a las células T CD4⁺ específicas a los 30 min. La activación temprana de las células T CD4⁺ podría ser importante para el control de la infección micobacteriana. Sin embargo, la producción de IFN- γ es regulada por IL-12, IL-23 y el eje IFN- γ IL-12/IL-23 y ésta se encuentra asociada a la defensa contra microorganismos como *Mycobacterium*, *Salmonella* y *Candida* [75-77]. En este sentido, Happel et al, observaron que la transfección del gen de IL-23 a células de un ratón *naïve* infectado con *Mtb* genera altos niveles locales de IFN- γ e IL-17 reduciendo el crecimiento micobacterial e incrementando el número de células T CD4⁺ activadas [78]. Por lo tanto con estos antecedentes y nuestros datos sugieren que el IFN- γ puede acelerar el tráfico de los complejos *Mtb* péptido-

MHC-II a la membrana plasmática de las células presentadoras de antígeno, lo cual resulta en un incremento de células TCD4⁺ activadas. El hecho de que el IFN- γ tenga efectos sobre el procesamiento y la presentación antigénica, el tratamiento de forma temprana a individuos con un alto riesgo de desarrollar tuberculosis podría ayudar a la inducción de una respuesta inmune eficiente para el control de la infección.

En contraste a lo observado con el pre-tratamiento con IFN- γ , el pre-tratamiento con IL-10 resultó en el ensamblaje y retención de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II en MIIC. Los resultados que obtuvimos fueron consistentes con previos estudios publicados por Koppelman et al, quienes demostraron que el tratamiento con IL-10 de monocitos humanos los llevan a una acumulación de complejos MHC-II en vesículas intracelulares [59]. Estudios recientes mostraron que el efecto inmunosupresor de la IL-10 en la presentación antigénica es mediado por MARCH 1, (membrane-associated RING-CH (MARCH) ubiquitin ligase family members) un miembro de la familia de las ligasas de ubiquitina que promueve la degradación de moléculas de MHC-II, estableciendo un mecanismo molecular relacionado con el efecto inhibitor de la IL-10 [79]. Nosotros proponemos que la IL-10 promueve la degradación de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II retenidos en los compartimentos de moléculas de clase II, y que este fenómeno podría estar asociado con la disminución de la detección de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II tanto en la membrana plasmática como en los compartimentos de las moléculas de clase II después de 60 minutos de procesamiento antigénico.

Mtb ha desarrollado diversos mecanismos de evasión, tales como la inducción de la IL-10, para prevenir el desarrollo de una respuesta inmune eficiente por el huésped [80]. En este estudio demostramos que el pre-tratamiento con la IL-10 altera el tráfico de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II a la membrana plasmática. Los complejos péptido-MHC-II retenidos en los compartimentos MIIC limita la carga del péptido a las MHC-II para la presentación antigénica en la membrana plasmática de las MDMs pre-tratadas con IL-10. Este resultado podría relacionarse con una disminución de la respuesta de células T *in vivo*, lo que nuestro grupo ha observado en células mononucleares periféricas de pacientes con tuberculosis, quienes también presentan niveles elevados de IL-10 [81, 82]. En los pacientes con una co- infección intestinal por helmintos y tuberculosis pulmonar, se observan altos niveles de IL-10 asociados con una mala respuesta al tratamiento antituberculosis y niveles disminuidos de células T CD4⁺CD25⁺ [83]. También se ha observado una susceptibilidad incrementada a tuberculosis pulmonar en pacientes quienes presentan polimorfismos en el alelo 2 de SLC11A1 (Nramp1), con aumento de la producción de IL-10 por monocitos en respuesta a lipopolisacárido [84].

Aunque nuestros resultados usando células T específicas a *Mtb* sugieren que los complejos *Mtb* péptido-MHC-II de MDMs pre-tratados con IFN- γ llegan más rápidamente a la membrana plasmática que los MDMs no tratados o los MDMs tratados con IL-10, nuestros experimentos no nos permiten la detección de los complejos de una forma directa, por ello usamos inmunofluorescencia para investigar de una forma directa el tráfico del antígeno Ag85B, un antígeno inmunodominante involucrado en la inmunidad protectora. Nuestros resultados

indican que el Ag85B puede ser detectado en asociación con las moléculas HLA-DR en la membrana plasmática de las MDMs después del pre-tratamiento con IFN- γ y estos datos son consistentes con la rápida respuesta de las células T inducida por la fracción de membrana plasmática en los MDMs tratados con IFN- γ . Sin embargo, el Ag85B no se detectó en la membrana plasmática de los MDMs tratados con IL-10, por lo que sugerimos que el medio ambiente de citocinas es importante en el procesamiento y tráfico intracelular de antígenos micobacterianos y complejos Ag85B-MHC-II.

Limitaciones

El número de experimentos por cada condición se limitó a 3 o 4 experimentos, esto por la dificultad metodológica del fraccionamiento subcelular el cual se realizó de forma manual.

Por otro lado, no fue posible hacer el seguimiento del tráfico intracelular del Ag 85B en las células MDMs como en las células THP-1.

Conclusión

En conclusión, el procesamiento antigénico eficiente y la presentación durante una infección micobacterial depende del balance inicial entre los niveles de IFN- γ e IL-10. Si predominan los niveles de IL-10, los complejos *Mtb* péptido-MHC-II son retenidos en los compartimentos MIIC, y la presentación antigénica será bloqueada. Al contrario si es IFN- γ , resultará en la formación de los complejos *Mtb* péptido-MHC-II en los fagosomas, seguido por un tráfico eficiente de los complejos a la membrana plasmática para la presentación antigénica y una adecuada inducción de la respuesta de células T.

Perspectivas

El significado biológico del efecto del IFN- γ en la respuesta temprana del procesamiento y la presentación antigénica es desconocido. Por lo tanto es necesario evaluar en modelos animales el efecto del pre-tratamiento con IFN- γ sobre el procesamiento de antígenos micobacterianos, así como su posible efecto sobre la generación de una respuesta inmune, aspecto muy importante de considerar en el diseño de nuevas vacunas útiles para el control de la tuberculosis.

Referencias

1. (OMS) OMdls. TB global report. WHO 2010.
2. Gruppo V, Orme IM. Dose of BCG does not influence the efficient generation of protective immunity in mice challenged with *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 2002;82(6):267-73.
3. Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, Mosteller F. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* 1994;271(9):698-702.
4. Schlesinger LS. Entry of *Mycobacterium tuberculosis* into mononuclear phagocytes. *Current topics in microbiology and immunology* 1996;215:71-96.
5. Hirsch CS, Ellner JJ, Russell DG, Rich EA. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor-alpha-mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. *J Immunol* 1994;152(2):743-53.
6. Deretic V, Singh S, Master S, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cellular microbiology* 2006;8(5):719-27.
7. Xu S, Cooper A, Sturgill-Koszycki S, van Heyningen T, Chatterjee D, Orme I, Allen P, Russell DG. Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-infected macrophages. *J Immunol* 1994;153(6):2568-78.
8. Armstrong JA, Hart PD. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *The Journal of experimental medicine* 1975;142(1):1-16.
9. Holsti MA, Allen PM. Processing and presentation of an antigen of *Mycobacterium avium* require access to an acidified compartment with active proteases. *Infection and immunity* 1996;64(10):4091-8.
10. Ramachandra L, Chu RS, Askew D, *et al.* Phagocytic antigen processing and effects of microbial products on antigen processing and T-cell responses. *Immunological reviews* 1999;168:217-39.
11. Ramachandra L, Noss E, Boom WH, Harding CV. Phagocytic processing of antigens for presentation by class II major histocompatibility complex molecules. *Cellular microbiology* 1999;1(3):205-14.
12. Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gehring AJ, Rojas RE, Torres M. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 2003;83(1-3):98-106.
13. Flynn JL, Chan J. Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Current opinion in immunology* 2003;15(4):450-5.
14. Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. *Annual review of cell and developmental biology* 1996;12:575-625.

15. Ernst JD. Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis. *Infection and immunity* 1998;66(4):1277-81.
16. Ozeki Y, Tsutsui H, Kawada N, *et al.* Macrophage scavenger receptor down-regulates mycobacterial cord factor-induced proinflammatory cytokine production by alveolar and hepatic macrophages. *Microbial pathogenesis* 2006;40(4):171-6.
17. Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol* 1990;144(7):2771-80.
18. Schorey JS, Carroll MC, Brown EJ. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science* 1997;277(5329):1091-3.
19. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999;17:593-623.
20. Pasula R, Downing JF, Wright JR, Kachel DL, Davis TE, Jr., Martin WJ, 2nd. Surfactant protein A (SP-A) mediates attachment of Mycobacterium tuberculosis to murine alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17(2):209-17.
21. Pasula R, Wright JR, Kachel DL, Martin WJ, 2nd. Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Invest* 1999;103(4):483-90.
22. Schlesinger LS. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of Mycobacterium tuberculosis is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol* 1993;150(7):2920-30.
23. 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(6):760-70.
24. Clemens DL, Horwitz MA. Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med* 1995;181(1):257-70.
25. Ramachandra L, Boom WH, Harding CV. Class II MHC antigen processing in phagosomes. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ 2008;445:353-77.
26. Deretic V, Via LE, Fratti RA, Deretic D. Mycobacterial phagosome maturation, rab proteins, and intracellular trafficking. *Electrophoresis* 1997;18(14):2542-7.
27. Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S, Deretic V. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *The Journal of cell biology* 2001;154(3):631-44.
28. Desjardins M. Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol* 1995;5(5):183-6.
29. Brumell JH, Scidmore MA. Manipulation of rab GTPase function by intracellular bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007;71(4):636-52.
30. Clemens DL, Horwitz MA. The Mycobacterium tuberculosis phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. *J Exp Med* 1996;184(4):1349-55.
31. Fenton MJ, Vermeulen MW. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infection and immunity* 1996;64(3):683-90.
32. Chua J, Deretic V. Mycobacterium tuberculosis reprograms waves of phosphatidylinositol 3-phosphate on phagosomal organelles. *J Biol Chem* 2004;279(35):36982-92.
33. Hart PD, Armstrong JA, Brown CA, Draper P. Ultrastructural study of the behavior of macrophages toward parasitic mycobacteria. *Infection and immunity* 1972;5(5):803-7.

34. Davis AS, Vergne I, Master SS, Kyei GB, Chua J, Deretic V. Mechanism of inducible nitric oxide synthase exclusion from mycobacterial phagosomes. *PLoS Pathog* 2007;3(12):e186.
35. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, *et al.* Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 1994;263(5147):678-81.
36. Vergne I, Chua J, Singh SB, Deretic V. Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome. *Annual review of cell and developmental biology* 2004;20:367-94.
37. Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 1999;97(4):435-47.
38. Fratti RA, Vergne I, Chua J, Skidmore J, Deretic V. Regulators of membrane trafficking and *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation block. *Electrophoresis* 2000;21(16):3378-85.
39. Via LE, Deretic D, Ulmer RJ, Hibler NS, Huber LA, Deretic V. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem* 1997;272(20):13326-31.
40. Briken V, Porcelli SA, Besra GS, Kremer L. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Molecular microbiology* 2004;53(2):391-403.
41. 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(2):910-8.
42. Pai RK, Convery M, Hamilton TA, Boom WH, Harding CV. Inhibition of IFN-gamma-induced class II transactivator expression by a 19-kDa lipoprotein from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential mechanism for immune evasion. *J Immunol* 2003;171(1):175-84.
43. Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 1998;16:323-58.
44. Lehner PJ, Cresswell P. Recent developments in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Current opinion in immunology* 2004;16(1):82-9.
45. Cresswell P. Antigen presentation. Getting peptides into MHC class II molecules. *Curr Biol* 1994;4(6):541-3.
46. Cresswell P. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 1996;84(4):505-7.
47. Denzin LK, Cresswell P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 1995;82(1):155-65.
48. Harding CV, Geuze HJ. Immunogenic peptides bind to class II MHC molecules in an early lysosomal compartment. *J Immunol* 1993;151(8):3988-98.
49. Harding CV. Intracellular organelles involved in antigen processing and the binding of peptides to class II MHC molecules. *Semin Immunol* 1995;7(6):355-60.
50. Ramachandra L, Song R, Harding CV. Phagosomes are fully competent antigen-processing organelles that mediate the formation of peptide:class II MHC complexes. *J Immunol* 1999;162(6):3263-72.
51. Ramachandra L, Noss E, Boom WH, Harding CV. Processing of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85B involves intraphagosomal formation of peptide-major histocompatibility complex II complexes and is inhibited by live bacilli that decrease phagosome maturation. *J Exp Med* 2001;194(10):1421-32.

52. Grotzke JE, Harriff MJ, Siler AC, Nolt D, Delepine J, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM. The Mycobacterium tuberculosis phagosome is a HLA-I processing competent organelle. *PLoS Pathog* 2009;5(4):1-13
53. Torres M, Ramachandra L, Rojas RE, Bobadilla K, Thomas J, Canaday DH, Harding CV, Boom WH. Role of phagosomes and major histocompatibility complex class II (MHC-II) compartment in MHC-II antigen processing of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages. *Infection and immunity* 2006;74(3):1621-30.
54. Via LE, Fratti RA, McFalone M, Pagan-Ramos E, Deretic D, Deretic V. Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. *Journal of cell science* 1998;111 (Pt 7):897-905.
55. Inaba K, Turley S, Iyoda T, *et al.* The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* 2000;191(6):927-36.
56. Schaible UE, Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Russell DG. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in murine macrophages. *J Immunol* 1998;160(3):1290-6.
57. Jutras I, Houde M, Currier N, *et al.* Modulation of the phagosome proteome by interferon-gamma. *Mol Cell Proteomics* 2008;7(4):697-715.
58. Trost M, English L, Lemieux S, Courcelles M, Desjardins M, Thibault P. The phagosomal proteome in interferon-gamma-activated macrophages. *Immunity* 2009;30(1):143-54.
59. Koppelman B, Neefjes JJ, de Vries JE, de Waal Malefyt R. 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(6):861-71.
60. Tan JS, Canaday DH, Boom WH, Balaji KN, Schwander SK, Rich EA. Human alveolar T lymphocyte responses to Mycobacterium tuberculosis antigens: role for CD4+ and CD8+ cytotoxic T cells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis. *J Immunol* 1997;159(1):290-7.
61. Canaday DH, Gehring A, Leonard EG, Eilertson B, Schreiber JR, Harding CV, Boom WH. T-cell hybridomas from HLA-transgenic mice as tools for analysis of human antigen processing. *J Immunol Methods* 2003;281(1-2):129-42.
62. Ramirez-Mata A, Michalak C, Mendoza-Hernandez G, Leon-Del-Rio A, Gonzalez-Noriega A. Annexin VI is a mannose-6-phosphate-independent endocytic receptor for bovine beta-glucuronidase. *Exp Cell Res*;317(16):2364-73.
63. de Araujo ME, Huber LA, Stasyk T. Isolation of endocytic organelles by density gradient centrifugation. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ 2008;424:317-31.
64. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, *et al.* Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992;256(5054):225-8.
65. MacMicking JD, Taylor GA, McKinney JD. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science* 2003;302(5645):654-9.
66. Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol* 2002;20:581-620.
67. Filipe-Santos O, Bustamante J, Chapgier A, *et al.* Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol* 2006;18(6):347-61.
68. Lah TT, Hawley M, Rock KL, Goldberg AL. Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases, cathepsins B and L, in macrophages. *FEBS Lett* 1995;363(1-2):85-9.

69. Meissner M, Whiteside TL, Kaufmann R, Seliger B. CIITA versus IFN-gamma induced MHC class II expression in head and neck cancer cells. *Arch Dermatol Res* 2009;301(2):189-93.
70. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999;401(6755):811-5.
71. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94(10):5243-8.
72. Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. Purification, characterization, and genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* urease, a potentially critical determinant of host-pathogen interaction. *J Bacteriol* 1995;177(19):5644-52.
73. Yates RM, Hermetter A, Taylor GA, Russell DG. Macrophage activation downregulates the degradative capacity of the phagosome. *Traffic* 2007;8(3):241-50.
74. Yates RM, Russell DG. Real-time spectrofluorometric assays for the luminal environment of the maturing phagosome. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ 2008;445:311-25.
75. de Beaucoudrey L, Samarina A, Bustamante J, Cobat A, Boisson-Dupuis S, Feinberg J. Revisiting human IL-12Rbeta1 deficiency: a survey of 141 patients from 30 countries. *Medicine (Baltimore)* 2010;89(6):381-402.
76. Jouanguy E, Doffinger R, Dupuis S, Pallier A, Altare F, Casanova JL. IL-12 and IFN-gamma in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Current opinion in immunology* 1999;11(3):346-51.
77. Pedraza S, Lezana JL, Samarina A, *et al.* Clinical disease caused by *Klebsiella* in 2 unrelated patients with interleukin 12 receptor beta1 deficiency. *Pediatrics* 2010;126(4):e971-6.
78. Happel KI, Lockhart EA, Mason CM, Porretta E, Keoshkerian E, Odden AR, Nelson S, Ramsay AJ. Pulmonary interleukin-23 gene delivery increases local T-cell immunity and controls growth of *Mycobacterium tuberculosis* in the lungs. *Infection and immunity* 2005;73(9):5782-8.
79. Thibodeau J, Bourgeois-Daigneault MC, Huppe G, *et al.* Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes. *European journal of immunology* 2008;38(5):1225-30.
80. Redford PS, Murray PJ, O'Garra A. The role of IL-10 in immune regulation during *M. tuberculosis* infection. *Mucosal Immunol*;4(3):261-70.
81. Torres M M-SP, Jimenez-Zamudio L, Teran L, Camarena A, Quezada R, Ramos E, and Sada E. Comparison of the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* antigens between a group of patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts. *Clinical and experimental immunology* 1994;96((1)):75-8.
82. Torres M, Herrera T, Villareal H, Rich EA, Sada E. Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and immunity* 1998;66(1):176-80.
83. Resende Co T, Hirsch CS, Toossi Z, Dietze R, Ribeiro-Rodrigues R. Intestinal helminth co-infection has a negative impact on both anti-*Mycobacterium tuberculosis* immunity and clinical response to tuberculosis therapy. *Clinical and experimental immunology* 2007;147(1):45-52.
84. Awomoyi AA, Marchant A, Howson JM, McAdam KP, Blackwell JM, Newport MJ. Interleukin-10, polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAM1), and susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis* 2002;186(12):1808-14.

ANEXOS