

Interferons de tipo I (type-I IFNs) e infecção micobacteriana*

Interferon type I and mycobacterial infection

Néio Boéchat.

RESUMO

Introdução: após a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, a grande maioria dos adultos controlam a proliferação micobacteriana intracelular. Diversos fatores (idade, estress, desnutrição, alcoolismo, infecções intercorrentes e câncer) têm sido correlacionados com a reativação da tuberculose. Durante as infecções virais, o IFN- α/β é produzido em grande quantidade. **Métodos:** estudo do efeito da estimulação direta dos macrófagos humanos pelo IFN- α sobre a multiplicação micobacteriana intracelular *in vitro*. **Resultados:** o pré-tratamento dos monócitos/macrófagos humanos com o IFN- α , aumentou de modo significativo o crescimento micobacteriano intracelular. **Conclusão:** nossos resultados são compatíveis com a idéia de que o aumento da produção do IFN- α , poderia contribuir para a reativação da tuberculose latente nos pacientes portadores de infecções virais agudas ou crônicas.

SUMMARY

Introduction: following infection with *Mycobacterium tuberculosis*, most adults are able to control mycobacterial proliferation. In a minority of individuals, a variety of factors (aging, stress, malnutrition, alcoholism, intercurrent infections, and cancer), can subsequently blunt this acquired resistance, resulting in the development of overt disease. IFN- α/β are copiously produced during viral infections. **Methods:** we evaluated the effect of IFN- α/β on mycobacterial growth in human macrophages *in vitro*. **Results:** after pretreatment of human monocytes with IFN- α striking loss of mycobacteriostatic activity of these cells was observed. **Conclusion:** these results are compatible with the possibility that the secretion of IFN- β could directly promote mycobacterial growth in patients harboring these organisms.

Descritores: *mycobacterium; macrófagos; interferon de tipo I; tuberculose.*

Keywords: *mycobacterium; macrophages; type I interferon; tuberculosis.*

*Os resultados aqui apresentados integram parte da tese de doutoramento: Boéchat, N. (2003) *Etude de l'interaction mycobacterie-macrophage*, 246 p. Th: Sciences: Paris 7, Bichat-Claude Bernard.

Lab. Multidisciplinar de Pesquisa - HUCFF UFRJ, Unid. de Pesquisa em Tuberculose e Divisão de Pneumologia e Tisiologia - IDT UFRJ
Endereço para correspondência: Néio Boéchat - Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - Av. Brigadeiro Trompowski, s/n.º, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ. Tel./fax: 00 55 21 25622669. E-mail: nbocchat@hucff.ufrj.br
 Artigo recebido para publicação no dia 05/06/03 e aceito no dia 02/07/03, após revisão.

Introdução

Os interferons (IFNs) fazem parte de uma família de glicoproteínas que são reconhecidamente capazes de interferir com a replicação viral. A denominação "interferons" reflete claramente esta propriedade. Estas citocinas são divididas em duas categorias, os interferons de tipo I e II, que têm estruturas, origens e funções diversas. O IFN tipo II é também conhecido como interferon gama (IFN- γ). Ele é produzido principalmente pelos linfócitos T_H1 ativados, pelas células citotóxicas CD8+, pelos macrófagos e células *natural killer* (NK).

O IFN- γ é capaz de modular a resposta imunitária adaptativa. O termo "interferons de tipo I" refere-se a um grupo heterogêneo de moléculas codificadas por diferentes genes, que apresentam funções diversas, ainda que similares e compartilham um receptor comum: o receptor dos IFN do tipo I ou IFNIR (1). Estas moléculas consistem em uma família de IFN- α (cerca de 12 nos murinos e 23 no homem), um IFN- β , um IFN- σ , um IFN- ω e um IFN- τ . Os IFN do tipo I são produzidos de maneira inespecífica, algumas horas após uma infecção viral.

Outros micro-organismos, como as bactérias intracelulares e certos tipos de moléculas (alguns ácidos nucleicos e oligonucleótidos sintéticos, double-strand-RNA fúngicos e produtos bacterianos diversos como os lipopolisacarídeos) são igualmente capazes de induzir a produção de IFN- α/β . As propriedades dos IFN- σ , IFN- ω e IFN- τ são atualmente muito pouco conhecidas (2).

Os diferentes IFN- α humanos apresentam uma homologia de suas seqüências peptídicas da ordem de 80-95% e da ordem de 30% com o IFN- β . As seqüências proximais em relação ao TATA box (região prevista como promotora do gene) são muito similares entre estes diferentes genes. Estas seqüências proximais são também essenciais para a expressão destes genes (1).

O significado biológico da existência dos numerosos genes IFN- α humanos é ainda completamente desconhecido. Os IFNs do tipo I agem através da ligação à seu receptor específico (IFNIR) localizado na membrana de diferentes tipos celulares, o que pode resultar na ativação da transcrição de numerosos genes. As vias de sinalização intra-celulares utilizadas por este receptor são similares àquelas que são utilizadas por muitas outras citocinas. A análise das seqüências dos genes induzidos pelo IFN- α/β revelou a existência de uma seqüência consenso ($^A/C$ NGAAANNGAAACT) presente na região 5'. Este elemento, denominado *IFN-stimulated response element* (ISRE), se encontra na região promotora dos genes induzidos pelo IFN e é indispensável à indução destes genes em resposta aos IFNs. Esta claramente

demonstrado que a presença de um ISRE na posição 5' de um gene é uma condição suficiente para tornar a expressão deste gene "indutível" pelos IFNs (3).

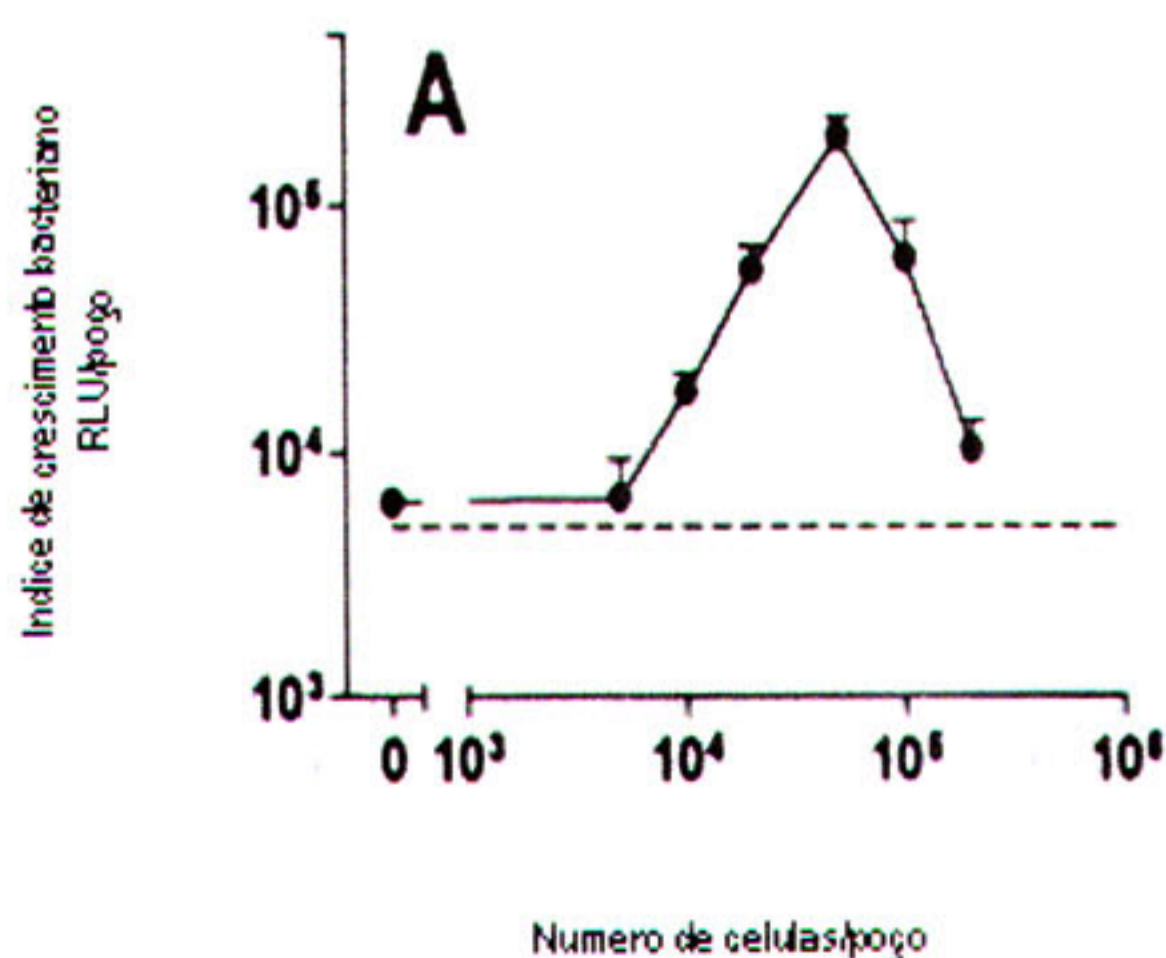
Quase todas as células do organismo são capazes de produzir IFN- α/β e deve ser lembrado que os macrófagos são considerados como uma das fontes celulares mais importantes, de IFN- α/β . Mesmo os macrófagos "em repouso" exprimem constitucionalmente pequenas quantidades de IFN- α/β (4). Todavia, até recentemente a identidade das principais células periféricas produtoras de IFN- α/β no homem ou nos murinos era completamente desconhecida.

Em 1999, Siegal e associados purificaram, a partir do sangue humano, células produtoras de IFN (*interferon producing cells IPCs*) capazes de produzir (após infecção) até 200 vezes mais IFN- α/β que todas as outras células do sangue periférico.

Os camundongos transgênicos deficientes em IFN de tipo I (*IFNIR*^{-/-}) são extremamente vulneráveis às diversas infecções virais. Entretanto são capazes de resistir normalmente às infecções causadas por diferentes bactérias intracelulares, tais como *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Leishmania major* (5,6).

Recentemente foi demonstrado que a instilação intra-nasal de IFN- α/β favorece a multiplicação micobacteriana intracelular nos pulmões de camundongos infectados experimentalmente com *M.*

Figura 1 - Efeito do número de células sobre o crescimento intracelular de *M. bovis* BCG. Macrófagos cultivados 3 dias em diferentes condições de densidade celular, isto é em presença de diferente número de células por poço de cultura, conforme indicado, e infectados. Sete dias após a infecção foram mensurados os índices de crescimento micobacteriano (relative light units, RLU) expressando o número de micobactérias intracelulares viáveis. \pm



tuberculosis (7). No estudo, a maior virulência de um isolado clínico de *M. tuberculosis* foi relacionada com uma produção exacerbada de IFN- α/β e com ausência de uma resposta do tipo T_H1. Neste contexto, é importante lembrar que o IFN- α/β é capaz de modular negativamente a produção de IFN- γ a partir da inibição direta da produção da interleucina 12 (IL-12) (8). Embora esta ação inibitória possa explicar o efeito deletério do IFN- α/β no controle da infecção micobacteriana, os possíveis efeitos diretos do IFN- α/β nos macrófagos não haviam sido precedentemente analisados. Aqui apresentamos os resultados da estimulação direta dos macrófagos humanos pelo IFN- α sobre a multiplicação bacteriana intracelular, em um modelo de infecção micobacteriana experimental *in vitro*.

Materiais e Métodos

Purificação e cultura de monócitos humanos

Os monócitos humanos (PBMC) foram isolados por densidade de centrifugação em Ficoll [Pharmacia, Upsalla, Sweden] a partir do sangue total de doadores saudáveis diluído 1/1 com *Iscove's modified Dulbecco's medium* IMDM [Sigma, St. Louis Mo.]. A viabilidade foi verificada inicialmente pela utilização do Trypan blue. Os monócitos com pureza e viabilidade superiores a 90% foram diretamente colocados em cultivo ou congelados a -80°C (em 10% DMSO).

Os monócitos foram ressuspensos em meio completo IMDM suplementado com 2mM L-glutamina, 200 U/ml de penicilina G, 1 ug/ml kanamicina e 20% de soro humano AB. A seguir estas células foram cultivadas em placas de 96 poços, fundo plano (2.10⁵/poço) em um volume final de 200ul/poço. As células foram mantidas a 37°C, 95% ar ambiente, 5% CO₂ durante três dias antes da infecção.

Para testar o efeito do IFN- α sobre a atividade micobacteriostática dos macrófagos em cultura, foram utilizadas diferentes concentrações de IFN- α (0,0005 a 10 ng). Na maioria dos casos as culturas foram pré-tratadas com IFN- α/β , três dias antes da infecção como previamente descrito (9).

Infecção dos monócitos/macrófagos.

Os monócitos/macrófagos foram cultivados por 3 dias e a seguir infectados como previamente descrito por Boéchat e col. (10), 2001. Em resumo: o meio foi removido e 25 ul da suspensão de micobactérias (*M. bovis* BCG) foram adicionados (e.g, 5.10⁴ micobactérias/poço), seguida pela adição de meio completo (175ul) suficiente para completar o volume final de 200ul/poço. A viabilidade das micobactérias foi analisada utilizando-

se live/died *BacLight viability stain* [Molecular Probes, Eugene OR].

Determinação do crescimento micobacteriano intracelular

A quantificação do número de micobactérias viáveis no interior dos monócitos/macrófagos, nos diferentes tempos do estudo (1, 4, 7 e 10 dias), foi realizada através da determinação do número de unidades formadoras de colônia CFU e/ou através da mensuração do índice de crescimento RLU (*relative light units*) apresentados por uma cepa de *M. bovis* BCG geneticamente modificada, capaz de exprimir o gene *luc-1* que codifica a luciferase, (10,11).

Resultados

Efeitos do IFN- α sobre a multiplicação micobacteriana no interior dos monócitos/macrófagos humanos

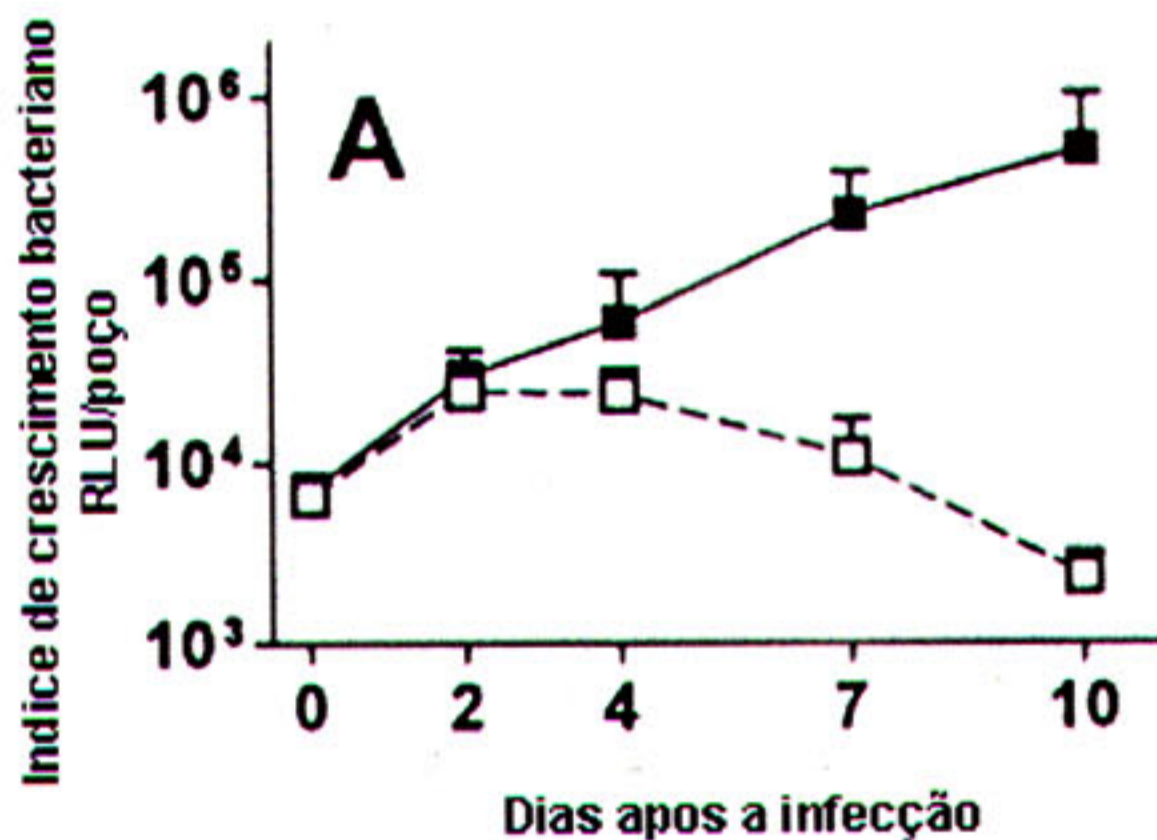
Quando as micobactérias foram cultivadas na ausência de macrófagos, o crescimento micobacteriano foi mínimo ou nulo (Fig.1). Quando os monócitos foram pré-tratados com IFN- α por 3 dias e a seguir sonificados antes da infecção, o crescimento micobacteriano foi semelhante ao crescimento observado na condição em que as micobactérias foram cultivadas na ausência de monócitos/macrófagos.

Estes achados mostram que o crescimento micobacteriano progressivo foi estritamente dependente da presença de monócitos viáveis e previamente tratados pelo IFN- α , e que a liberação de fatores pelas células mortas não estimulou o crescimento micobacteriano extracelular (dados não mostrados). O pré-tratamento (3 dias antes da infecção) dos monócitos/macrófagos humanos com o IFN- α , aumentou de modo significativo o crescimento micobacteriano intracelular. (Fig.2).

Discussão

Nos mostramos recentemente que a densidade das culturas de monócitos/macrófagos humanos influencia fortemente a atividade micobacteriostática destas células (12). Assim os monócitos/macrófagos humanos cultivados em condições de densidade elevada apresentam uma importante atividade anti-micobacteriana, enquanto estas mesmas células cultivadas em condições de baixa densidade exibem uma marcante permissividade ao crescimento micobacteriano. Os resultados aqui apresentados mostram que o pré-tratamento dos macrófagos humanos, cultivados em condições nas quais são

Figura 2 - Efeito do pré-tratamento dos macrófagos humanos com o IFN- α sobre o crescimento intracelular de *M. bovis* BCG. Monócitos foram cultivados (2×10^5 células/poço) em presença de 3000 U de IFN- α recombinante humano/ml (■) ou em presença unicamente do meio de cultura (□) por 3 dias e a seguir foram infectados com *M. bovis* BCG. Nos tempos indicados, os índices de crescimento micobacteriano foram mensurados. Os resultados expressam as médias \pm SD para 12 experimentos independentes utilizando monócitos de 12 diferentes indivíduos. O índice de crescimento micobacteriano (relative light units, RLU) dos monócitos não tratados e pré-tratados com IFN- α foi significativamente diferente nos dias 4, 7, e 10 ($p < 0,01$).



habitualmente capazes de controlar a replicação intracelular de *M. bovis* BCG, induz um efeito deletério significativo sobre a atividade micobacteriostática destas células.

O IFN- α é reconhecido como capaz de exercer uma miríade de efeitos não só sobre a diferenciação mas, igualmente sobre a função dos macrófagos.

Na tuberculose humana, admite-se que a evolução do estado de infecção latente para uma forma clinicamente aparente de tuberculose pode ocorrer em função de uma desregulação da resposta imunitária. De fato, as imunodeficiências adquiridas (como a infecção pelo HIV) ou primárias, o uso de imunodepressores, o alcoolismo, a desnutrição, o câncer e as infecções intercorrentes. A infecção pelos vírus do HIV tipos 1 e 2 estão associadas à tuberculose de reativação (13). Perturbações da resposta imunitária foram descritas durante o curso de diferentes infecções virais, como o sarampo. Numerosos relatos clínicos descreveram a associação entre o tratamento de várias condições clínicas pelo IFN- α/β e o diagnóstico de tuberculose e outras doenças micobacterianas.

Os resultados aqui apresentados são compatíveis com a possibilidade de que uma ação dependente da secreção de IFN- α possa promover diretamente a multiplicação micobacteriana nos pacientes portadores

da infecção tuberculosa clinicamente silenciosa (tuberculose latente). Esta claramente demonstrado, que as infecções virais constituem um estímulo potente para a produção e liberação do IFN- α (2). Desta forma, os resultados aqui apresentados são igualmente compatíveis com a idéia de que o grande aumento da produção do IFN- α , observado durante algumas infecções virais, poderia contribuir para uma maior vulnerabilidade dos pacientes portadores de certas infecções virais agudas ou crônicas para o desenvolvimento de formas clinicamente aparentes de tuberculose. Todavia, o papel exato do IFN- α nestas condições clínicas permanece amplamente desconhecido e novos estudos são necessários com o intuito de melhor compreender a influência do aumento da produção do IFN- α sobre a multiplicação micobacteriana *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Le Page C, Genin P, Baines MG, Hiscott J. Interferon activation and innate immunity. *Rev Immunogenet* 2000;2: 374-386.
2. Bogdan C. The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12: 419-424.
3. Kadowaki N, Liu YJ. Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* 2002;63: 1126-1132.
4. Belardelli F, Gresser I. The neglected role of type I interferon in the T-cell response: implications for its clinical use. *Immunol Today* 1996;17: 369-372.
5. Muller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 1994;264: 1918-1921.
6. Van den Broek MF, Muller U, Huang S, Zinkernagel RM, Aguet M. Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol Rev* 1995;148: 5-18.
7. Manca C, Tsenova L, Bergtold A, Freeman S, Tovey M, Musser JM, Barry CE, Freedman, VH, Kaplan G. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha/beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98: 5752-5757.
8. Cousens LP, Peterson R, Hsu S, Dorner A, Altman JD, Ahmed R, Biron CA. Two roads diverged: interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection. *J Exp Med* 1999;189: 1315-1328.
9. Bouchonnet F, Boéchat N, Bonay M, Hance AJ. Alpha/beta

- interferon impairs the ability of human macrophages to control growth of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 2002;70: 3020-3025.
10. Bonay M, Bouchonnet F, Pelicic V, Lagier B, Grandsaigne M, Lecossier D, Grodet A, Vokurka M, Gicquel B, Hance AJ. Effect of stimulation of human macrophages on intracellular survival of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin. Evaluation with a mycobacterial reporter strain. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159: 1629-1637.
 11. Boéchat N, Bouchonnet F, Bonay M, Grodet A, Pelicic V, Gicquel B, and Hance AJ. Culture at high density improves the ability of human macrophages to control mycobacterial growth. *J Immunol* 2001;166: 6203-6211.
 12. Boéchat, N. (2003) Etude de l'interaction mycobacterie-macrophage, 246 p. Th : Sciences : Paris 7, Bichat-Claude Bernard.
 13. Seng R, Gustafson P, Gomes VF, Vieira CS, Rabna P, Larsen O, Larouze B, Norberg R, Lisse IM, Samb B. Community study of the relative impact of HIV-1 and HIV-2 on intrathoracic tuberculosis. *Aids* 2002;16: 1059-1066.
 14. Fugier-Vivier I, Servet-Delprat C, Rivaller P, Rissoan MC, Liu YJ, Roubourdin-Combe C. Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J Exp Med* 1997;186: 813-823.
 15. Philippot, V., Yassir, F., Balme, B., and Perrot, H. (1996) [*Mycobacterium avium*-intracellulare subcutaneous abscess after injections of interferon alpha in a patient treated for lymphoma]. *Ann Dermatol Venereol* 123: 103-105.
 16. Philippot V, Yassir F, Balme B, Perrot H. [*Mycobacterium avium*-intracellulare subcutaneous abscess after injections of interferon alpha in a patient treated for lymphoma]. *Ann Dermatol Venereol* 1996;123: 103-105. ■
-