



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Facultad de Medicina

Co-regulación de la IL-12 e IFN-gamma y expresión
de sus receptores sobre células de pacientes con
tuberculosis pulmonar activa y sujetos sanos.

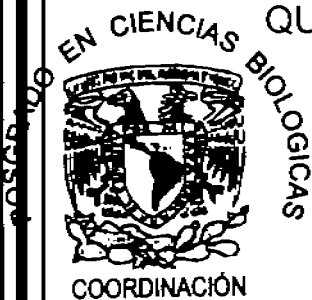
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARÍA TERESA HERRERA BARRIOS



DIRECTOR DE TESIS: DR. EDUARDO SADA DÍAZ

MEXICO, D.F.

ENERO, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 25 de junio de 2007, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **HERRERA BARRIOS MARIA TERESA** con número de cuenta **79394428** con la tesis titulada: "**CO-REGULACIÓN DE LA IL-12 E IFN-GAMMA Y EXPRESIÓN DE SUS RECEPTORES SOBRE CÉLULAS DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR ACTIVA Y SUJETOS SANOS.**", realizada bajo la dirección del **DR. EDUARDO SADA DÍAZ**:

Presidente:	DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
Vocal:	DR. RAFAEL S. SAAVEDRA DURÁN
Vocal:	DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN
Vocal:	DR. EDUARDO A. GARCÍA ZEPEDA
Secretario:	DR. EDUARDO SADA DÍAZ
Suplente:	DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO
Suplente:	DRA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 24 de noviembre de 2009


Dr. Juan Muñoz Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas** de la Universidad Autónoma de México por brindarme la oportunidad de superación académica.

A **CONACYT** por el apoyo recibido a través de una beca durante mis estudios de posgrado.

A **PAEP** por el apoyo recibido para presentar los resultados del mi proyecto de doctorado en el Congreso Internacional de Inmunología.

Al Comité Tutorial

Dr. Eduardo Sada Díaz

Dr. Eduardo A. García Zepeda.

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Dra. Gloria Soldevila Melgarejo

Un agradecimiento enorme por brindarme su tiempo, interés, comentarios, aportaciones y sugerencias que enriquecieron el desarrollo de mi proyecto de doctorado.

Al Dr. Eduardo Sada Díaz por haberme brindado su confianza y apoyo para desarrollar este proyecto de investigación.

Muy especialmente a los pacientes y los voluntarios sanos ya que sin ellos no habría sido posible llevar a cabo este protocolo.

A cada uno de los miembros del jurado por sus aportaciones y comentarios en la revisión de la tesis.

Dra. Yolanda López-Vidal
Dr. Rafael S. Saavedra Duran
Dra. Clara Inés Espitia Pinzón
Dr. Eduardo García Zepeda
Dr. Eduardo Sada Díaz
Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo
Dra. Gloria Soldevila Melgarejo

A la Dra. Martha Torres Rojas por todo el apoyo que me ha brindado, gracias por su amistad.

Al Dr. Stephan Schwander por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y le agradezco las enseñanzas invaluables que ha dejado en mi.

A mis compañeras de laboratorio ya que de alguna manera participaron en el desarrollo de este proyecto de investigación.

DEDICATORIA

A ti **Bonifacio** por tu apoyo, comprensión y sobre todo por el amor y la felicidad que me das cada día.

A ti **Sonni Omar** por ser la bendición más grande.

Bonifacio y Sonni Omar

Gracias por ser mi luz, mi fuerza, mi amor y mi felicidad.

A mis padres

Flora

y

Miguel (†)

por todo su amor y ejemplo.

A mis hermanos por todo lo que hemos compartido, los amo.

Este proyecto se realizó en el Departamento de investigación en Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias en colaboración con el Departamento de Medicina de la Universidad de Medicina y Dentistas de Nueva Jersey, recibiendo el financiamiento 2R01HL51630-10 de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos.

INDICE

Página

Abreviaturas.....	1
Resumen.....	3
1. Introducción.....	7
<i>1.1. Epidemiología de la tuberculosis.</i>	
<i>1.2. Tuberculosis en México.</i>	
<i>1.3. Transmisión de la enfermedad.</i>	
<i>1.4. Susceptibilidad genética.</i>	
<i>1.5. Patogenia de la tuberculosis pulmonar.</i>	
<i>1.5.1. Inmunidad innata en la tuberculosis.</i>	
<i>1.5.2. Inmunidad adquirida en la tuberculosis.</i>	
<i>1.5.3. Citocinas pro-inflamatorias e IFN-γ en la tuberculosis.</i>	
2. Planteamiento del problema.....	26
3. Hipótesis.....	27
4. Objetivos.....	28
5. Materiales y Métodos.....	29

- 5.1. Grupos de estudio.
- 5.2. Obtención y preparación de células bronquiolo alveolares (BAC).
- 5.3. Obtención y preparación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).
- 5.4. Preparación de la cepa H37Ra de *M. tuberculosis*.
- 5.5. Composición de las células bronquiolo alveolares (BAC).
- 5.6. Determinación de las poblaciones celulares por citometría de flujo.
- 5.7. Caracterización de las fuentes de IFN- γ intracelular por citometría de flujo.
- 5.8. Producción de IFN- γ en sobrenadantes de cultivos.
- 5.9. Determinación de IFN- γ por la técnica de ELISA.
- 5.10. Determinación de IL-4, IL-9, IL-10 e IL-12p70 en sobrenadantes de cultivo por Multiplex Bead Array Assay.
- 5.11. Determinación de IL-10 y TGF- β en los fluidos de los LBA.
- 5.12. Extracción de RNA total y síntesis de cDNA.
- 5.13. Análisis de la expresión de genes por PCR en tiempo real cuantitativo.
- 5.14. Análisis estadístico.

6. Resultados.....	41
7. Discusión.....	52
8. Conclusiones.....	61
9. Bibliografía.....	62

Abreviaturas

M.tuberculosis= *Mycobacterium tuberculosis*

TB= tuberculosis

TBP= Tuberculosis pulmonar

LBA= Lavado Bronquiolo Alveolar

BAC= Células Bronquiolo Alveolares

PBMC= Células Mononucleares de Sangre Periférica

Ac= Anticuerpo

rhIL-12= Interleucina 12 humana recombinante

IFN- γ = Interferón gamma

rhIFN- γ = Interferón gamma humano recombinante

IL-12R=Receptor de la IL-12

IL-12 β 1R= Subunidad β 1 del RIL-12

IL-12 β 2R= Subunidad β 2 del RIL-12

PHA= Fitohemaglutinina

PPD= Derivado proteico purificado de *M. tuberculosis*

RNA= Acido ribonucleico

mRNA=RNA mensajero

UFC= Unidades formadoras de colonia

PBS= Solución amortiguadora de fosfatos

PBS-SFB 0.5%= PBS con 0.5% de suero fetal bovino

cDNA= DNA complementario

NK= Asesinas naturales

ManLam= Lipoarabinomanana

MHC-I=Complejo Principal de Histocompatibilidad I

MHC-II=Complejo Principal de Histocompatibilidad II

MCP-1=Proteína quimiotáctica de monocitos-1

MIP-1 α =Proteína inflamatoria de macrófagos-1 α

TfR= Receptor de transferrina

RESUMEN.

En humanos la tuberculosis afecta principalmente a los pulmones y el desarrollo de una respuesta inmune tipo Th1 a nivel local juega un papel muy importante en el control de la infección al actuar directamente sobre *Mycobacterium tuberculosis* con la finalidad de controlar su crecimiento. Algunos aspectos de la inmunidad tipo Th1 en los espacios bronquiolo alveolares durante la tuberculosis pulmonar activa aún son objetos de estudio por lo que hemos caracterizado la respuesta inmune en células bronquiolo alveolares y sistémicamente en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con tuberculosis pulmonar activa y en controles sanos de la comunidad. La estimulación de las células bronquiolo alveolares con PPD y con la cepa viva H37Ra de *M. tuberculosis* causó la producción de IFN- γ por las subpoblaciones de linfocitos T alveolares CD4⁺, CD8⁺, $\gamma\delta$ TCR⁺, CD56⁺ y células NK (CD3⁻CD56⁺) siendo los linfocitos alveolares T CD4⁺ (principalmente CD45RO⁺) los principales productores de IFN- γ y además significativamente más abundantes en pacientes con tuberculosis ($p < 0.05$) en comparación con los sujetos sanos. La infección de las células bronquiolo alveolares con *M.tuberculosis* también indujo la producción de IL-12p70 e IL-4, encontrándose ambas citocinas aumentadas en los pacientes con tuberculosis en comparación a los controles sanos. El análisis los receptores demostró que la expresión constitutiva del mRNA de IL-12R β 1 e IL-12R β 2 en células bronquiolo alveolar y células mononucleares de sangre periférica y del IFN- γ R1 en células bronquiolo alveolares, mostraron resultados comparables entre los grupos de estudio. La producción de IFN- γ hacia antígenos micobacterianos y su inducción mediada por el IL-12R se lleva a cabo sin ninguna alteración en los espacios bronquiolo alveolares de los pacientes con tuberculosis

pulmonar activa. Estos hallazgos sugieren que los linfocitos presentes en las células bronquiolo alveolares de los pacientes con tuberculosis pulmonar activa son capaces de producir IFN- γ y probablemente la falla para controlar el crecimiento de *M.tuberculosis* durante enfermedad puede deberse a mecanismos inmunosupresores activos a nivel local como es la producción de algunas citocinas que antagonizan los efectos antimicrobianos del IFN- γ .

ABSTRACT.

Human tuberculosis principally involves the lungs and the development of a local immune response type Th1 plays a very important role in the control of infection on having actuated directly on *M.tuberculosis* with the purpose of controlling its growth. Some aspects of the immunity type Th1 in the spaces bronquiolo alveolar during the pulmonary active tuberculosis still are objects of study for what we characterized immune responses in bronchoalveolar cells and systemically in peripheral blood mononuclear cells in patients with active pulmonary tuberculosis and in healthy community controls. PPD and live strain H37Ra of *M.tuberculosis*-induced IFN- γ production was observed in CD4⁺, CD8⁺, $\gamma\delta$ TCR⁺, and CD56⁺ alveolar T cell subpopulations and NK cells (CD3⁻CD56⁺). IFN- γ -producing CD4⁺ T alveolar cells (mostly CD45RO⁺) as source of IFN- γ were more abundant ($p < 0.05$) in active pulmonary tuberculosis patients respect community controls. *M.tuberculosis*-induced IL-12p70 and IL-4, were increased ($p < 0.05$) in bronchoalveolar cells from active pulmonary tuberculosis patients more than in community controls. The receptors analysis demonstrated that constitutive expression of IL-12R β 1 and IL-12R β 2 mRNA in bronchoalveolar cells and peripheral blood mononuclear cells and IFN- γ R1 in bronchoalveolar cells was similar in both study groups. IFN- γ production in response to micobacterial antigens and its induction by IL-12R engagement occur virtually unimpaired in the bronchoalveolar spaces of patients with active pulmonary tuberculosis. These findings suggest that lymphocytes presents in bronchoalveolar cells from active pulmonary tuberculosis patients have the capacity to produce IFN- γ and the reasons for the apparent failure of *M. tuberculosis* growth control during active disease

may be several including of locally active immunosuppressive mechanisms such cytokines productions that subvert the antimycobacterial effects of IFN- γ .

1. INTRODUCCIÓN.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa que desde la antigüedad ha afectado a la humanidad y actualmente sigue representando un problema de salud pública a nivel mundial.

1.1. Epidemiología de la tuberculosis.

Mycobacterium tuberculosis (*M.tuberculosis*) es el agente causante de la tuberculosis humana y se ha estimado que la tercera parte de la población mundial (aproximadamente 2 billones) se encuentra infectada. Más del 95% de la población infectada se localiza principalmente en los países en desarrollo ya que dentro de los factores asociados a esta enfermedad se encuentran la pobreza, la desnutrición, la falta de servicios médicos o la falta de programas de salud encaminados al control de la enfermedad.

En la mayoría de los casos la infección es controlada eficientemente por el sistema inmune del hospedero manteniendo a *M.tuberculosis* en estado de latencia; sin embargo, existe el riesgo de desarrollar la enfermedad activa cuando el sistema inmunológico del hospedero se ve comprometido por infecciones que causan inmunodeficiencia como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (1), por las enfermedades autoinmunes con terapias inmunosupresores (1, 2), o bien, por enfermedades que alteran la respuesta inmune del individuo como es la diabetes mellitus y el cáncer (3).

De acuerdo a los reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), solamente del 5-10% de la población infectada desarrollará la enfermedad a lo largo de su vida, con excepción de las personas coinfectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

quienes tienen un riesgo mayor de presentar una reactivación de la tuberculosis latente, así como también tendrán un progreso rápido de la enfermedad después de una infección o re-infección con *M.tuberculosis* (1).

Datos proporcionados por la OMS reportan que en el 2006 a nivel mundial se registraron 9.2 millones de casos nuevos de tuberculosis (donde 0.7 millones son coinfectados con VIH) y 1.7 millones de muertes fueron causadas por esta enfermedad (donde 0.2 millones son coinfectados con VIH); estimándose además que la prevalencia mundial fue de 14.4 millones de casos. Se ha considerado que de no mejorarse significativamente las medidas de control de la tuberculosis entre el 2000 y 2020 se tendrán cerca de un billón de personas infectadas con *M.tuberculosis*, 200 millones de casos nuevos de tuberculosis y 35 millones de muertes causadas por la enfermedad.

1.2. Tuberculosis en México.

En México la tuberculosis también es un problema de salud pública ya que en nuestro territorio se localizan zonas endémicas que afectan principalmente a poblaciones desprotegidas. De acuerdo a los datos proporcionados por la OMS en el 2006 en México se registró una tasa de incidencia de 21; una tasa de prevalencia de 25 y una tasa de mortalidad de 2 (tasa= número de casos/ 100,000 habitantes) (4).

Cabe mencionar que el resurgimiento de la tuberculosis se encuentra asociado a diversos factores como son la aparición de cepas de *M. tuberculosis* muti-drogo-resistentes, la epidemia causada por el VIH (coinfección), la asociación con diabetes mellitus, la migración de personas de zonas endémicas y la prevalencia alta de la tuberculosis latente. A estos factores se agrega la existencia de la vacuna BCG que proporciona una eficiencia

limitada, aunado a la carencia de métodos de diagnóstico eficientes y la falta de programas de salud encaminados al control de la enfermedad.

1.3. Transmisión de la enfermedad.

M.tuberculosis ingresa al organismo principalmente por vía aérea y su transmisión es a través de aire ya que cuando una persona con tuberculosis pulmonar activa tose, estornuda o escupe, elimina las micobacterias en gotas pequeñas, las cuales pueden permanecer suspendidas en el medio ambiente por períodos largos de tiempo. Posteriormente, las micobacterias son inhaladas por un sujeto sano y las gotas grandes se depositan en las vías aéreas altas del tracto respiratorio como son la tráquea y los bronquios, y pueden ser removidas por el mecanismo mucociliar de limpieza. Las micobacterias pueden superar las barreras físicas y químicas presentes en el tracto respiratorio (cilios, células epiteliales, secreción de lisozima) y llegar hasta los alveolos pulmonares donde se establecen preferentemente en los sitios caracterizados por un presión alta de oxígeno como son las zonas apicales de los pulmones (5); ahí los macrófagos alveolares que constituyen la primera línea de defensa a nivel local fagocitan a la micobacteria y la infección primaria puede ser controlada eficientemente por el sistema inmune del hospedero; o bien, progresar hasta el desarrollo de la enfermedad en su forma activa. La OMS ha reportado que una persona con tuberculosis pulmonar activa constituye un foco de infección y potencialmente puede infectar a un promedio de 10 a 15 personas al año, por lo que se considera que en el mundo cada segundo se produce una infección nueva por *M.tuberculosis* (4).

1.4. Susceptibilidad genética a la tuberculosis.

En los humanos existen genes que confieren susceptibilidad para desarrollar la tuberculosis y algunos de estos genes son HLA-DRB1, HLA-DQB1 (6-8), el receptor de la vitamina D (7, 9, 10), la NRAMP-1 (*Natural Resistent Associated Macrophage Protein 1*) y variaciones en el promotor de DC-SIGN (*Dendritic Cell Specific Inter-Cellular Adhesion Molecular-3 Grabbing Non-integrin*) (11, 12) que es uno de los principales receptores para *M.tuberculosis* asociadas al desarrollo de la tuberculosis en poblaciones de Europa y Asia (13, 14). Por otra parte, los polimorfismos en los genes de la catepsina Z, el adaptador de Toll (TIRAP), el CR1 (*Complement Receptor 1*), el Ipr1 (*Intracellular Pathogen Resistent Protein 1*), el TLR2 y TLR4 aumentan el riesgo a desarrollar la tuberculosis (7, 13, 15).

También en humanos se han descrito mutaciones en el IFN- γ R1, IFN- γ R2, IL-12p40, IL-12R β 1, STAT1 y NEMO que causan una producción reducida de IFN- γ o TNF- α , lo cual altera la respuesta inmune del hospedero haciéndolos más susceptibles a infecciones diseminadas causadas por micobacterias y *Salmonella* (16, 17). Lo anterior se ha mencionado para señalar que existen factores genéticos del hospedero que lo predisponen a la infección por *M.tuberculosis*; sin embargo, quizá constituyen un porcentaje bajo con respecto a los casos totales de tuberculosis en el mundo.

1.5. Patogenia de la tuberculosis pulmonar.

La patogenia de la enfermedad puede dividirse en cuatro etapas. La primera (infección) es después que *M.tuberculosis* ha sido inhalada y ha ingresado a los alveolos pulmonares donde tiene su primer contacto con los macrófagos alveolares que son la

primera línea de defensa a nivel local, aunque también se ha descrito la importancia de las células dendríticas y los neumocitos tipo II. La micobacteria es fagocitada por los macrófagos o células dendríticas vía receptores de manosa y receptores de complemento/CR3 y su destrucción depende de la capacidad bactericida estas células así como también de los factores de virulencia de la micobacteria. Posteriormente en la segunda etapa (simbiosis) los macrófagos son incapaces de destruir a la micobacteria fagocitada y ésta se escapa de los mecanismos bactericidas intracelulares del macrófago y se multiplica hasta causar la destrucción del macrófago. A continuación, las micobacterias liberadas son fagocitadas por otros macrófagos alveolares, macrófagos no activados y monocitos provenientes de sangre periférica que han sido atraídos al sitio de infección por la liberación de las micobacterias, restos celulares, factores de complemento C5a y quimiocinas (RANTES, MCP-1, MIP-1 α e IL-8. Las micobacterias liberadas son fagocitadas rápidamente por los macrófagos inmaduros y se da una simbiosis entre las micobacterias y los macrófagos, ya que estos últimos no están activados y son incapaces de destruir a la micobacteria eficientemente y la micobacteria no daña a los macrófagos. En esta etapa los macrófagos inmaduros provenientes de sangre periférica son los responsables del destino de la lesión primaria que se caracteriza por la localización central de las micobacterias y los macrófagos alveolares en la periferia. Existe acumulación de los macrófagos y un crecimiento logarítmico de las micobacterias en la lesión y el daño al tejido es leve; sin embargo aún no se ha desarrollado la inmunidad adquirida y la reacción al PPD (derivado proteico purificado) es negativa (18, 19).

En la tercera etapa (2-3 semanas desde que el bacilo fue inhalado) empieza a haber liberación de antígenos micobacterianos y se desarrolla una respuesta inmune tipo Th1, por lo que los linfocitos T antígeno-específico llegan al sitio de la infección y proliferan en las lesiones primarias y activan a los macrófagos haciéndolos capaces de matar a la micobacteria intracelular. La necrosis sólida en el centro de las lesiones inhibe el crecimiento extracelular de la micobacteria y la infección entra en un estado de latencia. *M.tuberculosis* puede diseminarse a través de la circulación linfática hacia los nódulos linfáticos regionales del pulmón formando el complejo de Ghon, y en esta etapa se da la seroconversión a PPD positivo. La enfermedad puede progresar y la micobacteria diseminarse por la vía hematógena a varios órganos donde hay una concentración alta de oxígeno como son las zonas apicales de los pulmones, la corteza de los riñones, las vertebras y el sistema nerviosos central. En esta etapa algunos individuos desarrollan la enfermedad aguda y en algunos casos desarrollan la tuberculosis meníngea o tuberculosis miliar. Existe inflamación pleural causada por la liberación de la micobacteria o sus antígenos en los espacios pleurales donde interactúan con los linfocitos T CD4⁺ sensibilizados que han sido atraídos al sitio de la infección y donde proliferan y producen citocinas inflamatorias como IL-2, TNF- α e IFN- γ . Esta etapa se caracteriza por el dolor severo en el tórax y puede presentarse hasta por 2 años.

La última etapa o resolución del complejo de Ghon, se da cuando no hay progresión de la enfermedad, lo que puede darse hasta los 3 años. A pesar de que la tercera parte de la población mundial está infectada por *M.tuberculosis* solamente del 5-10% no controlará el complejo de Ghon y desarrollará la enfermedad en el primer año; adicionalmente del 3-

5% de los individuos desarrollará la enfermedad a lo largo de su vida por reactivación de una infección previa (18, 19).

1.5.1. Inmunidad Innata en la tuberculosis.

En los alveolos pulmonares existen mecanismos innatos de defensa donde participan diferentes tipos celulares como los macrófagos alveolares, las células dendríticas, los linfocitos T, los linfocitos B, las células epiteliales, los neutrófilos y los neumocitos tipo I y tipo II. Asimismo, existe la producción de factores solubles como la mucina, lisozima, lactoferrina, surfactantes, inmunoglobulinas, proteínas del complemento, fosfolipasa A₂, péptidos antimicrobianos y citocinas. La función primordial tanto de las células como de los factores solubles que se producen en el pulmón son la de mantener la homeostasis y además la eliminación de las partículas o bacterias que entren al tracto respiratorio.

Como parte de la inmunidad innata el proceso de fagocitosis juega un papel muy importante en la eliminación del agente infeccioso, y con respecto a *M.tuberculosis* se ha reportado que la propia micobacteria promueve su fagocitosis a través de los diferentes tipos de receptores expresados en la superficie de los macrófagos alveolares como son: receptores para Fc (FcR), receptores de complemento (CR1 y CR3/CR4), receptores de manosa (MR), receptores scavenger, receptores para la proteína surfactante A (SP-A) y el CD14 (20). Se ha descrito que el destino de la micobacteria depende la vía de entrada ya que cuando la micobacteria se encuentra opsonizada (IgG) y es internalizada de a través de los receptores FcR se promueve la producción de intermediarios de oxígeno

favoreciéndose la fusión fagosoma-lisosoma, mientras que su entrada a través de CR3 inhibe el estallido respiratorio y no hay maduración fagosomal (21).

Dentro de las características de la respuesta inmune innata está el reconocimiento de estructuras moleculares muy conservadas y ampliamente distribuidas entre patógenos denominadas PAMP's (*Patogen Associated Molecular Pattern*) por los TLRs (*Toll-like Receptors*) expresados en diferentes tipos de células del hospedero que directa o indirectamente contribuyen a la muerte del patógeno.

La interacción de los TLRs con su ligando despiertan una respuesta inflamatoria que se caracteriza por la activación de los macrófagos y las células dendríticas que aumentan: **1)** la expresión las moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86, CD40 y MHC-II; **2)** la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β y IL-6; **3)** la activación del endotelio local por el TNF- α y la IL-1 β causando la vasodilatación y aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos que permiten la extravasación de proteínas séricas y el reclutamiento de leucocitos al sitio de infección y **4)** la producción de óxido nítrico, quimiocinas y péptidos antimicrobianos (defensinas y LL-37) que participan en la respuesta inmune innata hacia el patógeno (22).

Se ha descrito que las lipoproteínas LprG, LprA y LpqH (19-kDa) de *M.tuberculosis* son ligandos de TLR2 y su interacción tiene diferentes efectos sobre la respuesta inmune como son la de inducir la producción de citocinas como IL-12, TNF- α e IL-10 (23), promover la maduración de los macrófagos y células dendríticas, las cuales, aumentan la expresión de CD86, CD40 y MHC-II y en consecuencia incrementan el procesamiento y la presentación de antígenos en el contexto de moléculas MHC-II (21-23).

Sin embargo, se ha demostrado que la exposición prologada de las células THP-1 con la lipoproteína de 19-kDa de *M.tuberculosis* (LpqH) y de macrófagos con LprG y LprA causan una disminución notable en la expresión de Fc γ R1 y MHC-II dependientes de la activación con IFN- γ , y en consecuencia, el procesamiento y presentación de *M.tuberculosis* y sus antígenos de naturaleza proteica se reduce. Estos resultados muestran que los procesos de señalización asociados al receptor de IFN- γ (IFN- γ R) son inhibidos por las lipoproteínas de *M.tuberculosis* lo que puede representar un mecanismo utilizado por la micobacteria para persistir dentro del macrófago.

Se ha especulado que la disminución de las moléculas MHC-II puede representar un mecanismo de control del sistema inmune dirigido a evitar una respuesta inflamatoria excesiva que dañe a los tejidos sanos. No obstante, al mismo tiempo esto puede representar una ventaja para *M.tuberculosis* que lo utiliza para sobrevivir dentro del macrófagos y evitar el reconocimiento por los linfocitos T CD4⁺ (23-25).

Existen otros componentes de *M.tuberculosis* que también son ligandos de TLR2 como son los glicolípidos LAM (*Lipoarabinomannan*) y PIM (*Phosphatidylinositol Mannosylated*) capaces de inducir la activación de NF- κ B (*nuclear factor κ B*), AP-1 (*activator protein-1*), MAP cinasas (*mitogen-activated-protein kinases*) y la producción de IL-8 (26) y TNF- α (27). También, la glicolipoproteína de 38kDa de *M.tuberculosis* induce la activación de MAP cinasas, ERK1/2 (*extracelular signal-regulated kinase 1/2*) y p38 con la producción de TNF- α e IL-6 a través de un mecanismo mediado por TLR2 y TLR4 (28).

Asociado al reconocimiento de los PAMP's a través de TLR's también se inicia la producción los péptidos antimicrobianos implicados en la muerte de las bacterias y se ha

descrito que juegan un papel importante en la inmunidad innata en el pulmón. Dentro de los péptidos antimicrobianos se encuentran las β -defensina que tienen efecto quimiotáctico sobre las células dendríticas inmaduras, monocitos y linfocitos T de memoria, pudiendo ser el enlace entre la respuesta inmune innata y inmunidad adquirida (29). Estudios con células epiteliales de pulmón (línea celular A549) y macrófagos alveolares humanos han demostrado que la cepa H37Rv de *M.tuberculosis* y el ManLAM (componente de la pared de *M.tuberculosis*) estimulan la expresión y producción de HBD-2 (β -defensina-2 humana) demostrando que también el epitelio pulmonar interacciona con los patógenos y puede tener una participación importante en la respuesta inmune temprana hacia *M.tuberculosis* (30). Paralelamente, en el modelo murino de tuberculosis latente la infección de las células epiteliales con *M.tuberculosis* estimula la producción de una gran cantidad de β -defensina-3, lo que sugiere que pueden participar en la muerte de la micobacteria y probablemente en la inducción del estado de latencia de la micobacteria (31). Existen otro tipo de péptidos antimicrobianos como son las catelicidinas dentro de la que encontramos a LL-37, que es un péptido antimicrobiano humano que en sinergismo con la IL-1 β causa la producción de IL-6, IL-10, MCP-1 y MCP-3 en células mononucleares de sangre periférica (32). También se ha descrito que LL-37 tiene un efecto quimiotáctico sobre las células inflamatorias (neutrófilos, linfocitos T, linfocitos B y macrófagos) y además recluta células dendríticas inmaduras para iniciar y facilitar la respuesta inmune adquirida (33). Recientemente se ha demostrando que los macrófagos alveolares, monocitos, neutrófilos y células epiteliales humanas producen LL-37 después de ser infectadas con *M.tuberculosis* lo que sugiere que junto con la HBD-2 producidas por los macrófagos alveolares y las células epiteliales del pulmón

pueden actuar en sinergismo contra *M.tuberculosis* durante la infección primaria, siendo su producción mediada por TLR9 (34).

El reconocimiento inicial *M.tuberculosis* por las células dendríticas y macrófagos a través de TLR's inducen la producción de factores solubles como quimiocinas (IL-8, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES) y citocinas (IL-12, IL-10, TNF- α e IL-6) que participan en el reclutamiento de células inflamatorias al sitio de infección y en el desarrollo de la respuesta inmune adquirida (20, 23-25, 29).

Dentro de las citocinas mencionadas se encuentra la IL-12 que es una citocina de producción temprana y constituye el puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adquirida ya que induce: la activación de los linfocitos citotóxicos, la diferenciación y proliferación de los linfocitos Th1 y la inducción de una respuesta inmune tipo Th1 ya que es un potente inductor de la producción de IFN- γ . Las células dendríticas, los macrófagos y los monocitos son las principales células productoras de la IL-12 (35) y existen estudios que demuestran que la interacción de la lipoproteína LprA de *M.tuberculosis* con TLR2 (23) y la fagocitosis de la micobacteria (36) son eventos que contribuyen en la producción de esta citocina.

1.5.2. Inmunidad Adquirida en la tuberculosis.

Posterior a la fagocitosis de *M.tuberculosis* por los macrófagos alveolares, la micobacteria es incluida en un fagosoma para formar el fagolisosoma donde, en un proceso dinámico, es destruida por los mecanismos bactericidas y proteolíticos intracelulares con la consecuente generación de antígenos de naturaleza proteica y glicolipídica. Una vez que los antígenos micobacterianos de naturaleza proteica son

procesados, los péptidos resultantes son acoplados a las moléculas MCH-I para ser presentados a los linfocitos T CD8⁺, o bien, son acoplados a las moléculas MCH-II y presentados a los linfocitos T CD4⁺, mientras que los antígenos de naturaleza glicolipídica (PIM, LAM, ácidos micólicos y hexosil-1-fofoisoprenoides) son acoplados a moléculas CD1 y presentados a los linfocitos T CD8⁻ y dobles negativos (CD4⁻CD8⁻) (14). La presentación de los antígenos constituye el paso de inmunidad innata a la inmunidad adquirida que se caracteriza por ser específica en el reconocimiento de antígenos por los linfocitos T que se activan y producen factores solubles como citocinas y quimiocinas con el objetivo de controlar la infección.

El control inmunológico de la infección con *M. tuberculosis* está basado en el desarrollo de una respuesta inmune tipo Th1 caracterizada por la participación de los macrófagos, las células dendríticas, los linfocitos T, los neutrófilos y la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-18, TNF- α (37-39), y quimiocinas como RANTES, MCP-1, MIP-1 α e IL-8 involucradas en el reclutamiento de células al sitio de infección para la formación del granuloma (40). Una respuesta no protectora se caracteriza por la producción de anticuerpos y citocinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-6, IL-10 y TGF- β que suprimen la respuesta inmune tipo Th1 que conlleva al desarrollo de la enfermedad (37, 38, 41, 42).

El desarrollo de la tuberculosis depende del equilibrio entre los factores de la respuesta inmune del hospedero y de los factores de virulencia propios de *M.tuberculosis*. La persistencia exitosa de *M.tuberculosis* en el pulmón depende de su capacidad para evitar y enfrentar la respuesta inmune haciendo uso de algunos mecanismos de evasión que ha desarrollado a través del tiempo como son: inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma

(43, 44), causando la disminución en la expresión de las moléculas MHC-II y CD1 en las células del sistema inmune para evitar la presentación de los antígenos micobacterianos de naturaleza proteica y lipídica respectivamente (23-25, 45, 46), induciendo la producción de IL-10 que favorece la síntesis del receptor soluble de TNF- α (sTNFR2) que neutraliza el TNF- α y de esta manera disminuir la apoptosis mediada por TNF- α de los monocitos infectados (45), causando la apoptosis de los linfocitos T $\gamma\delta$ específicos (47, 48) y modulando la expresión del receptor 1 de IFN- γ (IFN- γ R1) (49). Una vez que *M.tuberculosis* ha entrado a los alveolos pulmonares sus antígenos son reconocidos por los macrófagos a través de receptores de la inmunidad innata como son los TLR's, lo que inicia la producción de quimiocinas y citocinas que ayudarán al control de la infección. En el mejor de los casos, la IL-12 producida por los macrófagos como parte de la inmunidad innata promueve el desarrollo de una respuesta inmune adquirida tipo Th1 caracterizada por la producción de IFN- γ por los linfocitos T y las células NK (50). El IFN- γ tiene una función biológica muy importante en el control de infecciones por bacterias intracelulares como es *M.tuberculosis*, ya que activa los macrófagos a través de la interacción con su receptor específico (IFN- γ R) aumentando sus mecanismos bactericidas intracelulares y su capacidad de fagocitar, procesar y presentar los antígenos micobacterianos a los linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ induciendo la producción de IFN- γ (51). Se ha demostrado que la infección *in vitro* de macrófagos y PBMC humanos con *M.tuberculosis* causa una producción elevada de IL-10, TGF- β y niveles bajos de IL-12p70 (forma activa) asociada al aumento de la carga bacteriana; sin embargo, el pretratamiento de las células con IFN- γ reduce la producción de IL-10, TGF- β y la carga bacteriana, mientras que la producción de la IL-12 y la expresión de la enzima oxido

nítrico sintasa inducible (NOS2) involucrada en la producción de óxido nítrico se encuentran aumentadas, lo que demuestra el papel que juega el IFN- γ en el control de la infección (52). Los macrófagos también estimulan la producción de IFN- γ a través de la liberación de citocinas como IL-12 e IL-18, ya que en respuesta a antígenos micobacterianos los monocitos y PBMC producen IL-18 que correlaciona con la producción elevada de IFN- γ e IL-12 y una inmunidad protectora contra *M.tuberculosis* (53, 54) y *M.leprae* (55). Por otra parte, se ha demostrado que la producción del IFN- γ tiene un mecanismo de supresión mediado por las citocinas anti-inflamatorias como son la IL-10 y el TGF- β (37, 38, 52, 56).

En la respuesta inmune tipo Th1 los macrófagos, monocitos, células dendríticas y linfocitos T también producen TNF- α que es una citocina prototipo de la respuesta pro-inflamatoria. Se ha señalado que algunos componentes de *M.tuberculosis* como la lipoproteína LprA, las glicoproteínas LAM y PIM y la glicolipoproteína de 38kDa promueven su producción a través de un mecanismo mediado por TLR2 y TLR4 (23, 27, 28). La participación del TNF- α en la formación del granuloma como una estrategia para evitar la propagación de la infección causada por *M.tuberculosis* se ha demostrado en el modelo de tuberculosis latente en ratón, ya que la neutralización del TNF- α con un anticuerpo monoclonal causa la reactivación de la tuberculosis observándose aumento de la carga bacteriana y la producción de IL-10 mientras que la expresión de la enzima NOS2 está disminuida (57, 58); similarmente en humanos se ha observado una reactivación de la tuberculosis latente en pacientes con enfermedad de Crohn y artritis reumatoide tratados con anticuerpos anti-TNF- α (2, 58). Por otra parte, se ha demostrado que el TNF- α también promueve la apoptosis mediada por TNF- α /TNF- α R de

macrófagos infectados con *M.tuberculosis* como mecanismo orientado al control de la infección (59). En el modelo de ratón se ha puesto en evidencia que el sinergismo entre el IFN- γ y el TNF- α participa en la activación de los macrófagos induciendo la expresión de la NOS2 involucrada en la producción del óxido nítrico como mecanismo bactericida asociado a la muerte de la micobacteria. Sin embargo, en humanos, a pesar de la localización de NOS2 en los granulomas y en macrófagos alveolares de pacientes con tuberculosis pulmonar, el papel del óxido nítrico en el control del crecimiento micobacteriano aún es controversial (2, 21, 60, 61). La producción del TNF- α requiere de un control muy fino ya que la sobreproducción de esta citocinas puede causar la acumulación de células inflamatorias en el sitio de la infección, comprometiendo la función pulmonar y causando necrosis al tejido sano.

La IL-1 β es otra citocina pro-inflamatoria producida por macrófagos, monocitos, células dendríticas y está involucrada en la respuesta a *M.tuberculosis*, ya que en combinación con el TNF- α promueven el reclutamiento de las células inflamatorias al sitio de la infección favoreciendo la formación del granuloma (20).

1.5.3. Citocinas pro-inflamatorias e IFN- γ en la tuberculosis.

Dado que el IFN- γ es el prototipo una citocina pro-inflamatoria de la respuesta inmune tipo Th1 involucrada en la protección contra *M.tuberculosis*, existen diversos estudios que han evaluado los niveles del IFN- γ en sangre periférica de pacientes con tuberculosis pulmonar. Sin embargo, a pesar de ser una evaluación rápida que proporciona información importante, evidentemente no refleja la respuesta inmune en los

espacios bronquiolos alveolares que constituyen el sitio de entrada e infección por *M.tuberculosis* durante la tuberculosis pulmonar.

El estudio de la respuesta inmune en sangre periférica de pacientes con tuberculosis pulmonar ha demostrado que la producción del IFN- γ se encuentra disminuida y relacionada con la severidad de la enfermedad, es decir, a mayor severidad de la enfermedad menor producción del IFN- γ . Diferentes estudios han demostrado que la producción de niveles bajos de IFN- γ por las PBMC de pacientes con tuberculosis estimuladas *in vitro* con *M.tuberculosis* (62) o con diferentes antígenos micobacterianos (PPD, proteína de 30kDa) se debe a la presencia de citocinas anti-inflamatorias como son la IL-10 y el TGF- β que tienen un efecto inhibitorio sobre la producción del IFN- γ (37, 63). También se ha demostrado que la proliferación de linfocitos T antígeno-específicos y la producción de IL-12 e IFN- γ (41, 64-67) se encuentran suprimidas por el TGF- β producido por los monocitos y los macrófagos (37, 41, 42, 63, 68, 69).

A pesar de que los estudios en sangre han aportado información importante sobre la inmunidad en la tuberculosis pulmonar humana, ha sido de gran interés el estudio de la inmunidad en el pulmón ya que es el sitio donde directamente *M.tuberculosis* infecta y causa daño al hospedero.

En estudios sobre la respuesta inmune en el pulmón nuestro grupo han demostrado la presencia de alveolitis (inflamación en el alveolo pulmonar) y compartamentalización de linfocitos T (TCR/ $\alpha\beta$) [CD69⁺, MHC-II⁺, Tfr⁺] encontrándose además una gran cantidad de macrófagos alveolares inmaduros durante la tuberculosis pulmonar en adultos (70). Asimismo se demostró que existe un incremento en la proliferación de linfocitos T y en la producción de IFN- γ por células bronquiolos alveolares (BAC) estimuladas con

derivado proteico purificado de *M.tuberculosis* (PPD) (70, 71); esto ha sido apoyado por otros investigadores que han observado que constitutivamente existen niveles elevados de IFN- γ en BAC (72, 73), en muestras de esputo de pacientes adultos con tuberculosis (74) y en BAC de niños con tuberculosis pulmonar (75).

Como se ha mencionado la infección por *M.tuberculosis* se lleva a cabo por vía aérea alcanzando los alveolos pulmonares; y el desarrollo de la respuesta inmune innata se inicia cuando antígenos micobacterianos (PAMPs) son reconocidos por los macrófagos alveolares, monocitos y las células dendríticas a través de los TLRs induciendo la producción de citocinas como IL-12, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-15 e IL-18 (36, 54, 76-81) y quimiocinas como IL-8, RANTES, MCP-1 y MIP-1 α (26, 40) en respuesta a la infección.

La IL-12 como parte de la respuesta inmune innata se caracteriza por ser una citocina de producción temprana con un papel central en el desarrollo de la inmunidad adquirida ya que promueve la respuesta inmune tipo Th1, al ser: 1) un potente inductor de la producción del IFN- γ , 2) incrementar la proliferación de linfocitos T CD4⁺, 3) favorecer la expansión clonal de los linfocitos Th1 y 4) aumentar la citotoxicidad de los linfocitos T CD8⁺ y las células NK (35, 50, 82-84). La función biológica de la IL-12 (IL-12p70) está determinada por la interacción con su receptor específico de alta afinidad (receptor de IL-12, IL-12R) (85, 86), el cual se caracteriza por ser un heterodímero formado por dos subunidades denominadas subunidad β 1 (IL-12R β 1) y subunidad β 2 (IL-12R β 2), que se expresan solamente en linfocitos T y células NK activadas (87). Ambas subunidades tienen un patrón de expresión específico ya que mientras la subunidad IL-12R β 1 es expresada por las células Th1 y Th2 teniendo como función la de unirse directamente a la IL-12 (84), la

subunidad IL-12R β 2 se expresa exclusivamente en las células Th1 (88-90) y además de estar involucrada en la unión a la IL-12 también participa en la señalización mediada por la vía JAK-STAT para la producción de IFN- γ (84-87). La importancia de la señalización JAK-STAT asociada a interacción IL-12/IL-12R se ha demostrado en pacientes con mutaciones en la subunidad IL-12R β 1 (IL-12B1), lo que provoca una producción reducida de IFN- γ , y esto los predispone a infecciones diseminadas causadas por micobacterias y *Salmonella* (17, 91, 92). Como se ha mencionado previamente, el IFN- γ juega un papel muy importante en la respuesta inmune hacia bacterias intracelulares como es el caso de *M.tuberculosis* a través de regular la expresión de genes involucrados en funciones efectoras contra la micobacteria. La función biológica del IFN- γ es mediada a través de la interacción con su receptor específico y de alta afinidad (receptor de IFN- γ , IFN- γ R), induciendo la expresión de más de 200 genes implicados en el desarrollo de la respuesta inmune (51). Dentro de los mecanismos bactericidas inducidos por el IFN- γ en los macrófago están la producción de peróxido de hidrógeno y superóxido vía estallido respiratorio (60), la producción de óxido nítrico mediante la inducción de la enzima NOS2 y la producción de citocinas como el TNF- α , IL-12, IL-1 β e IL-6 (51).

La importancia del IFN- γ en el control de infecciones causadas por *M.tuberculosis* inicialmente fue demostrada en el modelo de ratón donde la eliminación del gen que codifica al IFN- γ (ratones knockout) causó la muerte de los animales infectados ya que son incapaces para controlar la infección con una dosis sub-letal de *M.tuberculosis* (60, 93). En humanos, la importancia del IFN- γ en el control de la tuberculosis ha sido puesta de manifiesto en los pacientes infectados con VIH donde la proporción de linfocitos CD4⁺ que son una fuente importante de IFN- γ se encuentra disminuida causando una

respuesta inmune Th1 deficiente y por lo tanto no hay control de la infección (94). Además, en humanos también se han descrito mutaciones hereditarias que afectan los genes involucrados en el eje IFN- γ /IL-12/IL-23 donde los pacientes se caracterizan por tener una gran susceptibilidad para desarrollar infecciones granulomatosas diseminadas causadas por micobacterias de baja virulencia como son *M.bovis* BCG, micobacterias no tuberculosis y *Salmonella* (16, 91, 92, 95-100) pero también son susceptibles a infecciones por micobacterias virulentas como es *M.tuberculosis* (91, 92, 100).

Durante la tuberculosis pulmonar activa existe una patología progresiva en el pulmón y se ha aislado a *M.tuberculosis* viable del tracto respiratorio poniendo de manifiesto que a pesar de existir datos publicados que apoyan las evidencias del desarrollo de una respuesta inmune tipo Th1 en el compartimiento bronquiolo alveolar (a nivel local) caracterizada por la producción de IFN- γ y factores solubles que participan un proceso inflamatorio (26, 40, 72, 74-76), paradójicamente no existe un mecanismo que permita controlar el crecimiento de la micobacteria.

Aunque existe gran conocimiento sobre la patogenia e inmunidad en la tuberculosis, aún existen aspectos que necesitan ser estudiados más a fondo para poder determinar cuál o cuáles son los factores involucrados en la incapacidad para controlar el crecimiento de *M.tuberculosis* durante la tuberculosis pulmonar activa humana a pesar de las evidencias del desarrollo de una respuesta inmune tipo Th1.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por *M.tuberculosis* y en la actualidad sigue representando un problema de salud pública ya que se ha estimado que la tercera parte de la población mundial se encuentra infectada.

La tuberculosis pulmonar es la principal forma de la enfermedad y el control de la infección requiere del desarrollo de una respuesta inmune Th1 caracterizada por la participación de macrófagos, linfocitos T y la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-18, IL-2) y quimiocinas (IL-8, RANTES, MCP-1 y MIP-1 α).

En la literatura existen reportes que han demostrado que durante la tuberculosis pulmonar humana existe una respuesta inmune celular tipo Th1 en el pulmón que se caracteriza por la presencia y proliferación de linfocitos T, el aumento de macrófagos inmaduros y la producción de IFN- γ a nivel local, sin embargo, no hay control del crecimiento de *M.tuberculosis* evidenciado por cultivo positivo.

Dado que al IFN- γ se le ha asignado un papel importante en el control de infecciones causadas por bacterias intracelulares como *M.tuberculosis* ya que induce la activación de los macrófagos al interactuar con su receptor específico (IFN- γ R), no hay correlación en la producción de IFN- γ en el pulmón y el control de la infección durante la tuberculosis pulmonar. Aún no se ha demostrado si el IFN- γ presente en el sitio de la infección lleva a cabo su función biológica a favor del huésped induciendo una activación eficiente de los macrófagos, o bien, ésta se ve alterada por la presencia de la micobacteria o producción de citocinas anti-inflamatorias por lo que es necesario llevar a cabo más estudios que nos permitan profundizar sobre la respuesta inmune en el pulmón durante la tuberculosis pulmonar activa.

3. HIPÓTESIS

Durante la tuberculosis pulmonar activa existe el desarrollo de una respuesta Th1 en el pulmón con la producción de IFN- γ pero no hay control de la infección causada por *M.tuberculosis*. Esto en parte, puede deberse a alteraciones en la expresión de los receptores de la IL-12 (IL-12R) y del IFN- γ (IFN- γ) asociado a la producción de citocinas anti-inflamatorias que bloquen la actividad anti-micobacteriana inducida por el IFN- γ .

4. OBJETIVOS.

Objetivo general

Estudiar la respuesta inmune adquirida en el espacio bronquiolo alveolar (pulmón) y en el compartimiento sistémico (sangre) de pacientes con tuberculosis pulmonar activa para determinar las alteraciones causadas por la infección con *M.tuberculosis*.

Objetivos particulares:

- 1) Caracterizar las poblaciones celulares en el pulmón y en sangre periférica.
- 2) Definir el fenotipo de las poblaciones de linfocitos T alveolares productores de IFN- γ .
- 3) Estudiar la expresión y producción de IFN- γ antígeno-específica y mediada por el receptor de la IL-12.
- 4) Determinar la producción de citocinas pro-inflamatorias (IFN- γ , IL-12 y TNF- α) y anti-inflamatorias (IL-4, IL-9, IL-10 y TGF- β) por las células bronquiolo alveolares y células mononucleares de sangre periférica.
- 5) Analizar la expresión de receptores de citocinas de la respuesta inmune tipo Th1 como son el receptor de la IL-12 (IL-12R) y el receptor del IFN- γ (IFN- γ R).

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

Este protocolo fue revisado y aprobado por los Comités de Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (México) y de la University of Medicine and Dentistry of New Jersey, (Estados Unidos).

5.1. Grupos de estudio.

A todos los voluntarios se les explicó detalladamente los procedimientos a los que serían sometidos (toma de una muestra de sangre y broncoscopia) y su participación fue voluntaria proporcionando su consentimiento por escrito.

Se les hicieron estudios de laboratorio como: biometría hemática completa, química sanguínea, perfil de lípidos y serología para el Virus de Inmunodeficiencia Adquirida tipo 1; se les tomó una radiografía de tórax y se les aplicó la prueba cutánea de PPD, la cual, fue leída a las 72 hrs.

Pacientes con tuberculosis pulmonar activa (TB). Se incluyeron 8 pacientes (4 hombres y 4 mujeres) con diagnóstico de TB pulmonar activa que asistieron al servicio de Neumología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. El diagnóstico fue establecido por síntomas clínicos, hallazgos en la placa de tórax, baciloscopías positivas (++, +++), cultivo positivo para *M.tuberculosis* y se descartó la multi-drogo-resistencia. Dos pacientes presentaron tuberculosis moderadamente avanzada mientras que seis tuvieron tuberculosis muy avanzada de acuerdo a los criterios radiológicos de la ATS (*American Toracic Society*) (101). Todos los pacientes fueron PPD positivo (teniendo de

10-35 mm de induración a las 72 hrs). El promedio de duración de la terapia anti-tuberculosis previa a la realización del estudio fue de 5 días.

Sujetos sanos de la comunidad (Sanos). Se incluyeron 14 sujetos sanos de la población abierta (9 hombres y 5 mujeres) reclutados por anuncio en el periódico. Los voluntarios sanos no mostraron evidencias clínicas o radiológicas de enfermedades respiratorias y sin antecedentes de contacto pasado o actual con pacientes con tuberculosis. Seis fueron PPD negativo (0 mm), tres con induración ≤ 10 mm y cinco > 10 mm.

La edad promedio de los pacientes con tuberculosis y los voluntarios sanos fue de 29 años (rango 19-60 años). Siete de los ocho pacientes con tuberculosis y 13 de 14 sujetos sanos tuvieron cicatriz indicativa de recibir la vacuna BCG durante su niñez.

5.1.1. Criterios de inclusión

a) Pacientes con tuberculosis.

Tener el diagnóstico de TB pulmonar activa, con edad entre 18-60 años, de preferencia no haber tenido previa terapia anti-tuberculosis, no presentar hemoptisis, no tener anemia, ser VIH negativo, no tener alguna otra enfermedad que cause inmunosupresión como diabetes mellitus, cáncer, etc.

b) Controles sanos.

Tener edad entre 18-60 años, no tener anemia, no tener ninguna enfermedad, ser VIH negativo y no tener ni haber tenido contacto con pacientes con TB.

5.2. Obtención de las células bronquiolo alveolares (BAC). Las BAC se obtuvieron a partir del lavado bronquiolo alveolar (LBA). Brevemente, después de anestesia local de las vías aéreas altas con xilocaína al 2% y lidocaína al 1% para prevenir la tos, se les introdujo un broncoscopio fibróptico flexible (P30, Olympus BF, New Hyde Park, NY) en dos segmentos pulmonares radiológicamente afectados en el caso de los pacientes con TB ó en el lóbulo medio derecho y la língula en los voluntarios sanos. Posteriormente, se inyectó solución salina estéril (37°C) en alícuotas de 20 ml con inmediata recuperación del líquido haciendo un total de 300 ml. La recuperación del líquido del LBA fue del 72% y 68 % en pacientes con TB y sanos respectivamente. El LBA se llevó al laboratorio y las BAC se recuperaron por centrifugación de la muestra a 1200 rpm durante 15 minutos a 4°C. Las BAC fueron resuspendidas en medio de cultivo suplementado [RPMI 1640 con 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (BioWhittaker, Walkersville, MD)], se contaron las células y se ajustaron a 1×10^6 células por mililitro con medio completo [medio suplementado con 10% de suero humano AB descomplementado (Gemini, Woodland, CA)] y se determinó la viabilidad celular por exclusión de azul de tripano (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY); obteniéndose una viabilidad de 95% (mediana, Rango 93-99%). La recuperación de las BAC fue mayor en los pacientes con TB (mediana, 55×10^6) con respecto a los sanos (mediana, 31×10^6). El fluido de los LBA se guardaron a -20°C para posterior determinación de citocinas (IL-10, TGF-β) por la técnica de ELISA.

5.3. Obtención de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC). A los voluntarios se les tomó una muestra de sangre venosa (120-180 ml) con heparina y fue

diluida 1:2 con medio RPMI 1640 suplementado y posteriormente se centrifugó a 1200 rpm durante 45 minutos a temperatura ambiente en un gradiente de densidad Ficoll-Paque (densidad=1.077 g/ml) (Axis-Shield PoC As, Oslo, Norway). Las PBMC se recuperaron de la interfase y se lavaron dos veces con medio suplementado. Finalmente, las PBMC se resuspendieron en medio completo, se contaron y ajustaron a 1×10^6 células por mililitro. Se determinó la viabilidad por exclusión de azul de tripano siendo de 99% (mediana, Rango 98-100%).

5.4. Preparación de la cepa H37Ra de *M.tuberculosis* para la infección in vitro. La cepa H37Ra de *M.tuberculosis* (ATCC 25177, Manassas, VA) se cultivó en medio líquido Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, MI) suplementado con 10% Albúmina-Dextrosa-Catalasa (Difco Laboratories, Detroit, MI) y 0.2% de glicerol. La micobacteria se incubó durante 21 días a 37°C con agitación constante y posteriormente fue transferida a tubos de 50 ml y se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos. Se eliminó el medio y las micobacterias se resuspendieron en medio líquido Middlebrook 7H9 fresco haciendo alícuotas de 1 ml, las cuales, se guardaron a -70°C. Posteriormente, para determinar la concentración de las micobacterias se seleccionaron tres viales al azar, se descongelaron y se centrifugaron. Se eliminó el sobrenadante y las micobacterias se resuspendieron en medio infectante (RPMI 1640 con 2 mM de L-glutamina, 50 µg/ml de sulfato de gentamicina suplementado con 30% de suero humano AB sin descomplementar) y con la finalidad de dispersar los agregados de micobacterias se agregaron cinco perlas de vidrio de 3 mm y se mezcló durante 5 minutos en vortex. La suspensión de las micobacterias fue nuevamente centrifugada a 1000 rpm durante 2

minutos y el sobrenadante donde se localizan las micobacterias individuales se transfirió a otro tubo; a partir de esta suspensión se hicieron diluciones seriadas en medio Middlebrook 7H9 que fueron sembradas por triplicado en placas de agar 7H10. Después de 21 días de incubación se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) y se determinó la concentración del stock de micobacterias. Para cada experimento, se preparó una suspensión fresca de micobacterias llevando a cabo la infección *in vitro* de las BAC y monocitos para obtener la multiplicidad de infección (MOI) de 10 (relación bacteria-célula).

5.5 Análisis morfológico en las células bronquiolos alveolares (BAC). Para determinar si existían diferencias en las poblaciones celulares (macrófagos, linfocitos y neutrófilos) presentes en el pulmón de los pacientes con TB y sujetos sanos se analizó la composición de las BAC. Para esto se tomaron 0.12×10^6 BAC y se hizo un frotis en un portaobjetos utilizando una citocentrífuga para después hacer la tinción de Wright. Las preparaciones fueron analizadas utilizando un microscopio óptico y se contaron en promedio 400 células reportando los resultados en porcentaje para las diferentes poblaciones celulares.

5.6. Caracterización de las subpoblaciones de linfocitos T por citometría de flujo. También nos interesó determinar si existían diferencias en las subpoblaciones de linfocitos T en las BAC y PBMC entre los pacientes con TB y sujetos sanos por lo que se hizo el análisis por citometría de flujo. Brevemente, para hacer la tinción de superficie se tomaron 2×10^5 de BAC o PBMC en medio completo y se incubaron con los anticuerpos (Ac's) monoclonales anti-humano conjugados a fluorocromos anti-[CD3-PerCp (clona

SK7), CD4-FITC (clona SK3), CD8-FITC (clona SK1), CD56-FITC (clona NCAM 16.2) y TCR $\gamma\delta$ -FITC (clona 11F2) (BD Biosciences, San José, CA)] durante 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron con PBS-Suero Fetal Bovino al 1% (PBS-SFB 1%) y se fijaron con paraformaldehído al 1%. En la tinción se incluyeron los isotipos γ_1 PerCp, γ_1 FITC, γ_{2a} FITC, los cuales, se utilizaron de referencia para establecer los cuadrantes en el análisis. Se adquirieron 20,000 eventos en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson) y para el análisis se utilizó el programa Cell Quest versión 3.3 (Becton Dickinson). Para analizar las subpoblaciones de los linfocitos T alveolares se seleccionó la región de los linfocitos CD3⁺ conforme al dot plot CD3⁻ vs granularidad; mientras que el análisis de las células NK (CD3-CD56+) se hizo dentro de la región de linfocitos seleccionada conforme a tamaño vs granularidad. La presencia de las diferentes subpoblaciones de linfocitos se reportaron como porcentaje de células positivas.

5.7. Fenotipo de las células productoras de IFN- γ intracelular por citometría de flujo.

Uno de los objetivos del estudio fue determinar si existía diferencia en las celulares productoras de IFN- γ entre el pulmón y en la sangre periférica de los pacientes con TB y sujetos sanos, por lo que hizo la caracterización en las BAC y PBMC por citometría de flujo. Brevemente, 2x10⁶ BAC o 1 ml de sangre periférica sin estímulo o estimuladas *in vitro* con 10 μ g de PPD (Derivado Proteico Purificado de *M.tuberculosis*, Statens Serum Institute, Copenhague, Dinamarca) o infectadas con la cepa H37Ra de *M.tuberculosis* viva (MOI de 10; 10 bacteria por cada célula) fueron incubadas durante 12 hrs (37°C y 5% de CO₂) en presencia de brefeldina A (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) a una

concentración final de 10µg/ml durante las últimas 4 hrs de incubación. Se hizo la tinción de superficie en 2×10^5 BAC o 100µl de sangre periférica con los Ac's anti-humano anti-[CD3-PerCp (clona SK7), CD4-FITC (clona SK3), CD8-FITC (clona SK1), CD56-FITC (clona NCAM 16.2), TCRγδ-FITC (clona 11 F2) y CD45RO-FITC (clona UCHL-1)] durante 15 minutos, y posteriormente en las muestras de sangre se lisaron los eritrocitos con solución de lisis 1X (Becton Dickinson) por incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron las células con PBS-SFB 0.5%. Se procedió a permeabilizar la membrana celular por incubación con la solución para permeabilizar 1X (Becton Dickinson) durante 15 minutos, después y se hizo la tinción intracelular con los Ac's anti-IFN-γ PE (clona 25723.11), anti-CD69FITC (clona L78) y los respectivos isotipos por incubación durante 30 min. Las células fueron lavadas y fijadas con paraformaldehído al 1%. Los resultados se reportaron como porcentaje de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, TCRγδ⁺, CD56⁺ y CD45RO⁺ positivas productoras de IFN-γ en la región de linfocitos CD3⁺, mientras que la proporción de células NK productoras de IFN-γ se analizaron en la región de linfocitos seleccionada conforme al tamaño vs granularidad.

5.8. Producción del IFN-γ en sobrenadantes de cultivos de las BAC y PBMC. Para definir si el IFN-γ detectado intracelularmente (citometría de flujo) es secretado por las células, entonces determinamos su concentración en los sobrenadantes de cultivo de las BAC y PBMC de los pacientes con TB y sujetos sanos estimuladas *in vitro*. Brevemente, se agregaron 1×10^6 BAC o PBMC/pozo en placas de cultivo de 24 pozos y fueron estimuladas con 10 µg de PPD, 5 ng de rhIL-12 (IL-12 recombinante humana, R&D System Co.), 5 ng rhIL-12 + 5 µg de PHA o infectadas con la cepa H37Ra de

M.tuberculosis viva (MOI 10) y se incubaron durante 24 hrs (37°C y 5% CO₂). Se recolectaron los sobrenadantes y se guardaron a -70°C para determinar la presencia de citocinas por la técnica de ELISA. Por otra parte, las células se lisaron con 200µl de trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) para hacer el análisis de la expresión de genes por PCR cuantitativo en tiempo real.

5.9. Determinación de IFN-γ por la técnica de ELISA. Se sensibilizó la microplaca de 96 pozos toda la noche a 4°C con 50 µl/pozo de una dilución 1:1000 en PBS del Ac de captura anti-IFN-γ humano (Endogen, Woburn, MA). La microplaca se lavó 3 veces con 200 µl de PBS-0.05% Tween 20, y se bloqueó durante 15 minutos con 100µl/pozo de Superblock Blocking Buffer (Thermo Scientific, Rockford, IL). Se lavó la placa y se adicionaron 50 µl/pozo de diferentes concentraciones del estándar de IFN-γ humano recombinante (1000 a 15.6 pg/ml) o los sobrenadantes de cultivo (directos o en dilución) incubando por 2 hrs a 37°C. Se lavó la placa y se agregaron 50µl/pozo del Ac anti- IFN-γ humano conjugado a biotina a dilución 1:2000 (Endogen, Woburn, MA); después de 1 hr de incubación se lavó nuevamente la placa y se agregaron 50µl/pozo de una dilución 1:2000 de la enzima fosfatasa-alcalina conjugada a avidina (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA). Se lavó la placa y se agregaron 50µl/pozo del sustrato pNN (4-Nitrofenil fosfato disódico hexahidratado, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) permitiendo el desarrollo del color y la reacción fue detenida con EDTA al 5%. Se hizo la lectura de la placa a 450 nm en un Microplate Reader (Labsystems Multiskan MCC/340, Labsystems, Finland). Se determinó la concentración de IFN-γ en los sobrenadantes de acuerdo a la curva del estándar y los resultados se reportaron en ng/ml.

5.10. Determinación de la IL-4, IL-9, IL-10 e IL-12p70 en sobrenadantes de cultivo por Multiplex Bead Array Assay. Para determinar el perfil de citocinas que se producen localmente durante la tuberculosis se determinó la presencia de IL-4, IL-9, IL-10 e IL12p70 en los sobrenadantes de cultivo las BAC y PBMC no estimuladas o estimuladas *in vitro* con 5µg de LPS (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) o infectadas con la cepa H37Ra de *M.tuberculosis* (MOI 10). Las muestras se analizaron por duplicado utilizando el Beadlyte Multiplex Immunoassay kit siguiendo las instrucciones del fabricante (Upstate, Temecula, CA). La lectura de las placas se hizo en el lector Luminex 100TM y los resultados se reportaron en pg/ml.

5.11. Determinación de IL-10 y TGF-β en los fluidos de los lavados bronquial por la técnica de ELISA. Con la finalidad de determinar el perfil de citocinas producidas durante la tuberculosis pulmonar se determinó la presencia de IL-10 y TGF-β en la primera alícuota del fluido de los LBA por la técnica de ELISA. La técnica se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones del fabricante (R&D System Co. Palo Alto, CA). Brevemente, las muestras de fluido de LBA y las diluciones de los respectivos estándares de las citocinas (IL-10 y TGF-β) se agregaron en los pozos de la microplaca de 96 pozos previamente sensibilizada con el Ac de captura (anti-IL-10 o anti-TGF-β humano). Después de la incubación durante 2 hrs a 37°C se hicieron dos lavados de la placa y se adicionó el Ac conjugado a la peroxidasa, incubando durante 1 hr a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y se agregó el sustrato enzimático permitiendo el desarrollo de color durante 30 minutos. La reacción enzimática se detuvo con la solución

de paro y se hizo la lectura a 405nm. La concentración de IL-10 y TGF- β se determinó con referencia a la curva estándar y los resultados se reportaron en pg/ml.

5.12. Extracción de RNA total y síntesis de cDNA. Con la finalidad de determinar si existían diferencias en la expresión de genes de citocinas y receptores en la tuberculosis pulmonar, se hizo la extracción del RNA total utilizando el Método de Chomczynski (102). Brevemente, el lisado celular se mezcló con un volumen equivalente de cloroformo (Merck) y se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 14000 rpm. La fase acuosa se transfirió a otro tubo y el RNA se precipitó con isopropanol frío (Merck) y nuevamente se centrifugó para obtener el RNA. Después de lavar el RNA con etanol frío al 75% se dejó secar por evaporación y se resuspendió en agua-DEPC (Biowhittaker, Walkersville, MD). Para determinar la concentración y pureza del RNA se hizo una dilución de la muestra de RNA y se hizo una lectura a 260 nm y 280nm en un NanoDrop espectrofotómetro (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE).

Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis de cDNA utilizando el SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el RNA total se mezcló con dNTP's 10mM y hexámeros como iniciadores y se incubó a 65°C durante 5 minutos. Después se agregó la mezcla de transcripción reversa (10X solución amortiguadora, 25mM de MgCl₂, 0.1M DTT, RNaseOUT inhibidor de Ribonuclease) y la enzima SuperScript II. La síntesis del cDNA se llevó a cabo a 25 °C durante 10 minutos, 42 °C durante 50 minutos y 70 °C por 10 minutos en un termociclador (Eppendorf, Co.) y finalmente se trató con RNasa H durante 20 minutos a 37°C. Se determinó la concentración y pureza del cDNA haciendo

la lectura a 260nm y 280nm y se prepararon diluciones de cada muestra a una concentración de 20ng/ml para hacer el análisis de la expresión de genes por PCR cuantitativo en tiempo real.

5.13. Análisis de la expresión de genes por PCR cuantitativo en tiempo real. Se estudió la expresión de los genes de IFN- γ , IL-12R β 1, IL-12R β 2, IFN- γ R1 y TNF- α mediante el análisis del mRNA y se utilizó como gen constitutivo el RNA ribosomal 18S (rRNA 18S). Para determinar la expresión de rRNA 18S, IFN- γ y TNF- α se utilizaron los Pre-Developed Taqman Assay (Applied Biosystem, Foster City, CA); mientras que para el análisis de IL-12R β 1, IL-12R β 2 e IFN- γ R1 los iniciadores y las sondas específicas fueron diseñadas con el programa Primer Express (Applied Biosystems,Co.) y sintetizados por la misma compañía. En experimentos preliminares se identificó el gen constitutivo rRNA 18S como el gen más estable al comparar su expresión en las BAC y PBMC estimuladas y no estimuladas; para este experimento se utilizó la placa TaqMan Human Endogenous control (Applied Biosystem,Co.) que incluye 11 genes alternativos (proteína ribosomal ácida, beta actina, ciclofilina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerocinasa, β 2-microglobulina, β -glucoronidasa, hipoxantina ribosil transferasa, factor de transcripción, proteína de unión a la caja TATA y el receptor de transferrina). Para analizar la expresión de los genes de interés seguimos las instrucciones del fabricante. Brevemente, se preparó la mezcla de reacción con mezcla universal (dNTP's, Taq polimerasa, MgCl₂), iniciadores y sonda específica para cada gen de interés marcada con un fluorocromo (r18S-VIC y FAM para los demás genes de interés) y agua-DEPC, se mezcló y se agregó a la placa de 96 pozos junto con la muestra

(60 ng/pozo de cDNA) llevando la reacción a un volumen final de 50µl. La placa se cubrió con plástico adhesivo y se centrifugó 5 minutos a 2000 rpm para eliminar las burbujas. La amplificación se llevó a cabo en un ABI Prisma 7700 Sequencer Detection System (Applied Biosystems, Co) iniciando con 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos y 40 ciclos (95°C por 30 segundos y 60°C por 30 segundos). Se utilizó el método de cuantificación absoluta incluyendo una curva de calibración con 7 diluciones seriadas de un plásmido donde se ha insertado el fragmento para amplificar, el cual fue incluido en cada placa (para cada gen de interés y el constitutivo). La curva y las muestras se analizaron por triplicado y se hizo la normalización de cada uno de los genes de interés con respecto al gen constitutivo (rRNA 18S). La curva estándar se utilizó para determinar el número de copias de mRNA del gen de interés.

5.14. Análisis estadístico. Se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U rank test para comparar los resultados de pacientes con TB pulmonar activa y los sujetos sanos. El análisis se hizo utilizando el software SPSS Statistical, versión 13.0 (2004) y la significancia estadística fue considerada con una $p \leq 0.05$.

6. RESULTADOS.

6.1. Morfología de células en el pulmón durante la tuberculosis pulmonar activa. Con la finalidad de determinar si existen diferencias en cuanto a las poblaciones celulares presentes en el pulmón de los pacientes con TB y los sujetos sanos se analizó la composición celular en las BAC y los resultados mostraron que existen diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (Tabla 1). Los macrófagos alveolares se encontraron disminuidos significativamente en los pacientes con TB (mediana, % Macrófagos alveolares: TB= 67 vs. sanos=95); mientras que los linfocitos alveolares (mediana % LA: TB=16 vs. sanos=5 $p \leq 0.05$) y los neutrófilos (mediana, % Neut: TB=3 vs. sanos=0 $p \leq 0.05$) se encontraron aumentados significativamente en comparación con los sujetos sanos. Los resultados demostraron que existe aumento en la población de células inflamatorias en los pacientes con TB mostrando que hay el desarrollo de una respuesta inmune del hospedero con la finalidad de controlar la infección.

6.2. Los linfocitos T $CD4^+$ son la principal supoblación en las BAC de los pacientes con TB. Además de conocer la composición celular en el pulmón de los pacientes con TB también fue de interés determinar el fenotipo, el estado de activación y producción de citocinas de las células presentes en las BAC y PBMC de los pacientes con TB y sujetos sanos. Después de obtener los resultados de la morfología celular en el pulmón que nos mostraron que existe aumento de los linfocitos y neutrófilos que en las BAC de los pacientes con TB, ahora el enfoque fue estudiar los linfocitos T ya que son fuente de citocinas y juegan un papel importante en la respuesta inmune. Consecuentemente se

investigó la proporción de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T en las BAC y PBMC por citometría de flujo y los resultados se muestran en la Tabla 2.

Previamente, en la literatura se ha descrito que hay aumento de los linfocitos alveolares durante la tuberculosis pulmonar activa en humanos (70, 71) y nuestros resultados (Tabla 2) confirman la alveolitis linfocítica en los pacientes con TB; observándose un aumento significativo de tres veces en el número de linfocitos T en pacientes con TB comparado con los sujetos sanos (mediana %CD3⁺; TB=15 vs. sanos=5, $p \leq 0.05$). Además, se encontró que los linfocitos T alveolares CD4⁺ se encuentran aumentados significativamente en los pacientes con TB en comparación con los sujetos sanos (mediana %; TB= 70 y sanos=48, $p \leq 0.05$), siendo esta población la que se encuentra en mayor proporción en el pulmón con respecto al resto de las poblaciones analizadas.

La proporción de linfocitos T CD8⁺ alveolares y periféricos fueron comparables entre los grupos de estudio (mediana % BAC vs. PBMC: TB= 20 vs. 26 y sanos= 27 vs. 23, respectivamente), y significativamente menor en comparación con los linfocitos T CD4⁺ alveolares y periféricos ($p \leq 0.001$). Los linfocitos TCR $\gamma\delta$ ⁺ alveolares se encontraron disminuidos significativamente en los pacientes con TB.

No se encontraron diferencias significativas en la recuperación de las BAC ni en la frecuencia de los linfocitos alveolares CD3⁺CD56⁺ y CD3⁻CD56⁺ entre los grupos de estudio. Pero es importante hacer notar que en los pacientes y en los sujetos sanos las células NK (CD3⁻CD56⁺) se encuentran disminuidas en el espacio bronquiolo alveolar en comparación con la sangre, con respecto a los pacientes esto puede deberse a la etapa crónica de la enfermedad donde la inmunidad innata no es la principal respuesta del hospedero.

(%)	Macrófagos alveolares	Linfocitos alveolares	Neutrófilos
Sanos (n=14)	95 (88-97)	5 (3-12)	0
TB (n=8)	* 67 (54-83)	* 16 (10-28)	* 3 (2-29)

Tabla 1. Aumento de las células inflamatorias en el pulmón de los pacientes con TB pulmonar activa. Se tomaron células bronquiolo alveolares y se hizo un frotis y posteriormente se hizo la tinción de Wright. Las preparaciones se analizaron en el microscopio y se reportó el porcentaje de las diferentes poblaciones celulares. Los valores corresponden al valor de la mediana y entre paréntesis los percentiles 25-75%. (* $p \leq 0.05$, Sanos vs. TB, Mann-Whitney)

	Sanos (n=13)		TB (n=8)	
	BAC	PBMC	BAC	PBMC
# BAC/10 ml LBA [10^6]	1.4 (0.9-1.8)	-	2.3 (1.4-2.7)	-
% CD3 ⁺ BAC	5 (2-15) *	-	15 (8-26)	-
% CD3 ⁺ CD4 ⁺	48 (45-51) *	59 (56-66) **	70 (57-72)	62 (53-67)
% CD3 ⁺ CD8 ⁺	27 (17-38)	23 (15-27)	20 (15-28)	26 (18-27)
% CD3 ⁺ CD56 ⁺	10 (6-13)	3 (2-8)	7 (5-9)	7 (5-8)
% CD3 ⁻ CD56 ⁺	4 (3-6)	14 (10-21) **	3 (3-4)	16 (13-20) **
% CD3 ⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺	7 (3-10) *	3 (2-5) **	5 (4-7)	5 (4-7)

Tabla 2. Fenotipo de los linfocitos T en las células bronquiolo alveolares (BAC) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Para caracterizar las subpoblaciones se hizo la tinción de superficie de las BAC o PBMC con los anticuerpos monoclonales anti-CD3PerCp, FITC (anti-CD4, CD8, CD56 y $\gamma\delta$ TCR) para análisis por citometría de flujo. La región de los linfocitos (CD3⁺) se analizó y los resultados se reportaron en porcentaje. Excepto para las BAC en el líquido de los LBA. Los valores corresponden al valor de la mediana y entre paréntesis los percentiles 25-75%. (* $p \leq 0.05$, Sanos vs. TB en BAC; ** $p \leq 0.05$ BAC vs. PBMC autólogos, Mann-Whitney U-test).

Por otra parte, en los sujetos sanos los linfocitos periféricos $CD4^+$ y $CD3^+CD56^+$ se encontraron aumentados ($p \leq 0.05$), mientras que los linfocitos $CD3^+TCR\gamma\delta^+$ periféricos se encuentran disminuidos ($p \leq 0.05$) con respecto a los linfocitos alveolares autólogos.

6.3. Aumento en la activación y producción de IFN- γ en los linfocitos alveolares de los

pacientes con TB pulmonar activa. Además de estudiar las diferentes subpoblaciones celulares en el pulmón y en sangre periférica, otro de los objetivos fue analizar el estado de activación y de la producción de IFN- γ por los linfocitos, por lo cual, se procedió a hacer el análisis en los linfocitos T alveolares y periféricos por citometría de flujo.

Se utilizó como marcador de activación temprana de los linfocitos a la glicoproteína de superficie CD69 y se determinó la producción de IFN- γ intracelular. En la Figura 1A y 1B se muestra la respuesta de linfocitos T alveolares al estímulo con PPD de un sujeto sano y un paciente con TB pulmonar; mientras que en la Figura 1C se muestran los resultados en los grupos de estudio. Puede observarse que los linfocitos T alveolares de los pacientes con TB se encuentran constitutivamente más activados y además producen más IFN- γ en comparación con los linfocitos T alveolares de los sujetos sanos (mediana % TB vs sanos: 2 vs. 13, $p \geq 0.05$). Después de la estimulación *in vitro* con el PPD o la infección con *M.tuberculosis* (MOI de 10) se observó un incremento significativo en la activación y producción de IFN- γ en los linfocitos T alveolares de los pacientes con TB (mediana %TB vs. sanos: PPD, 44 y 5; *M.tuberculosis*10, 46 vs. 5, $p \leq 0.05$) a diferencia de los linfocitos alveolares de los sujetos sanos que mantuvieron una activación y producción de IFN- γ reducida.

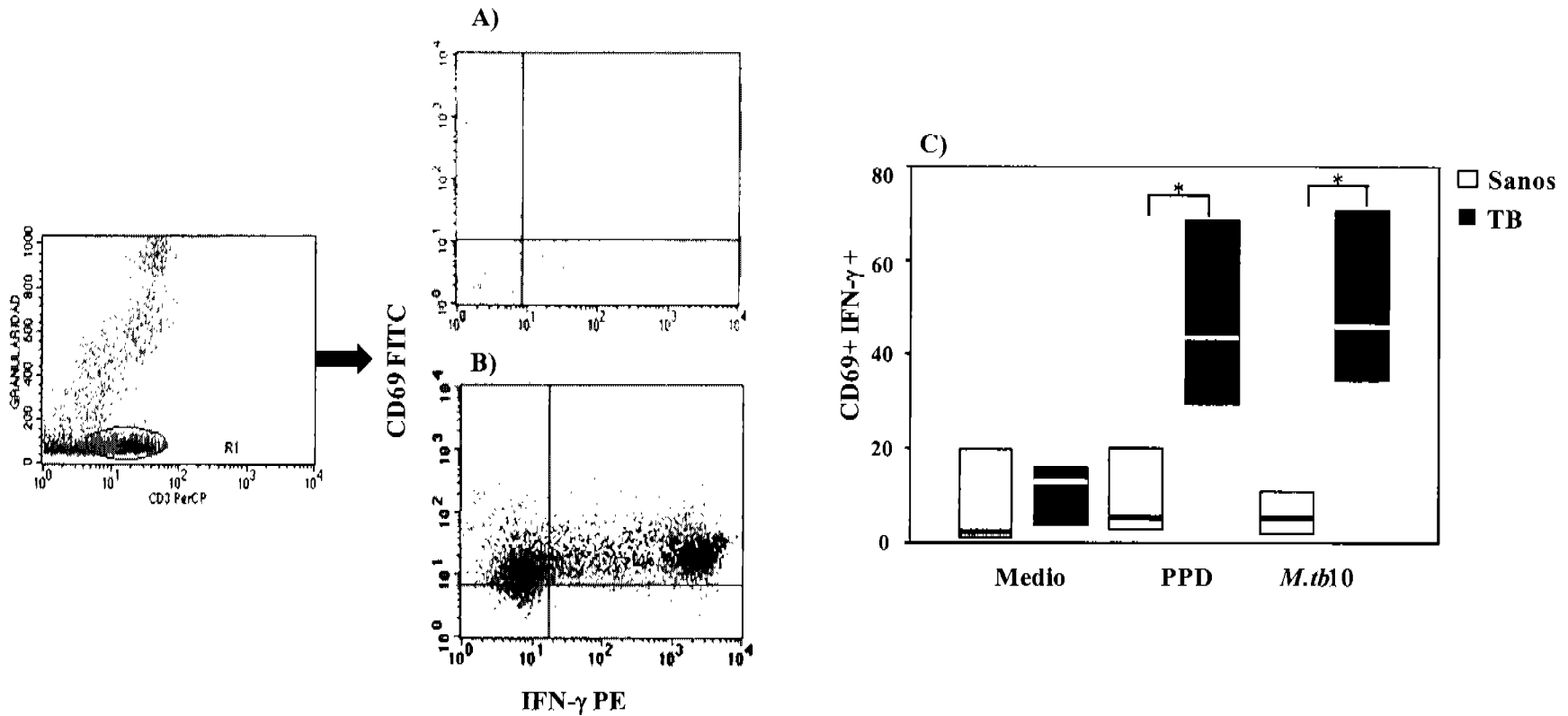


Figura 1. Activación y producción de IFN- γ por linfocitos T alveolares. Las BAC fueron estimuladas con PPD o infectadas con la cepa H37Ra de *M.tuberculosis* a una proporción de 10 micobacterias por célula (*M.tb* 10) durante 12 hrs. Posteriormente se hizo la tinción de superficie con el Ac anti-CD3PerCp y se permeabilizó la membrana para hacer la tinción intracelular con los Ac's anti-CD69FITC y anti-IFN- γ PE. Se muestran los linfocitos T alveolares estimulados con PPD; **A)** Sujeto sano, **B)** Paciente con TB; **C)** Activación y producción de IFN- γ por linfocitos T alveolares. (Sanos n=7, TB n=6) (* p \leq 0.05, Mann-Whitney U-test).

Estos resultados demuestran que la capacidad de activación y producción de IFN- γ por parte de los linfocitos T alveolares de los pacientes con TB no se encuentra suprimida por efecto de la infección, sino más bien parece estar exacerbada.

6.4. Los linfocitos alveolares CD4⁺ son la principal fuente de IFN- γ en el compartimiento bronquiolo alveolar durante la TB pulmonar activa. Posteriormente se procedió a caracterizar por citometría de flujo el fenotipo de los linfocitos T alveolares ya que participan en la producción de de IFN- γ en el pulmón. Los resultados de la Figura 2A muestran que hay una producción constitutivamente baja de IFN- γ por los linfocitos T alveolares CD4⁺ comparable entre los grupos de estudio (mediana % TB vs. sanos: 4 y 1, $p \geq 0.05$). Sin embargo, en respuesta al estímulo *in vitro* con PPD o infección con *M.tuberculosis* existe un aumento significativo de linfocitos T alveolares CD4⁺ productores de IFN- γ en comparación con los sujetos sanos (Median %, TB vs. sanos: PPD, 46 vs. 6 and *M.tuberculosis*, 37 vs. 4, $p \leq 0.05$), esto puede deberse a la compartimentalización hacia el pulmón de linfocitos T-Ag-específico en los pacientes con TB.

Además, en pacientes con TB se encontraron aumentados linfocitos alveolares CD8⁺, TCR $\gamma\delta$ ⁺, CD3⁺CD56⁺ y células NK que contribuyen a la producción local de IFN- γ (CD8⁺ [PPD] y NK [*M.tuberculosis*], $p \leq 0.05$) (Figura 2B, 2C, 2D y 2E).

La proporción de las subpoblaciones de linfocitos T y células NK periféricas (PBMC) productoras de IFN- γ fueron significativamente menores (mediana 10%, $p \leq 0.05$) en comparación a las BAC autólogas en ambos grupos (Datos no mostrados) demostrando que existen diferencias entre la respuesta inmune local y periférica.

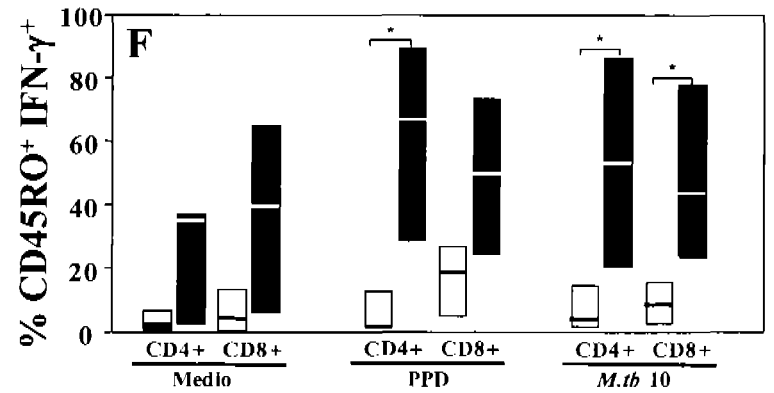
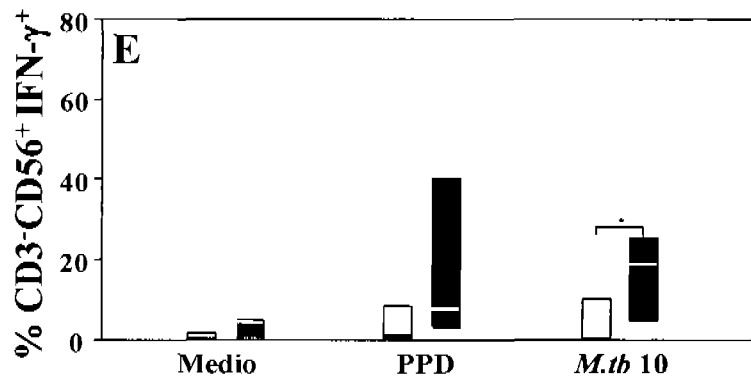
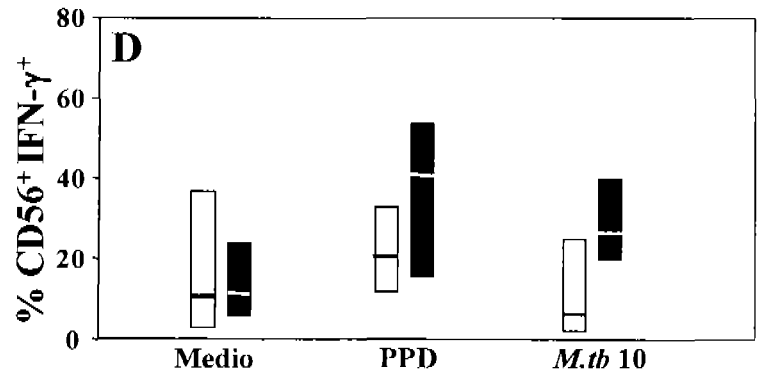
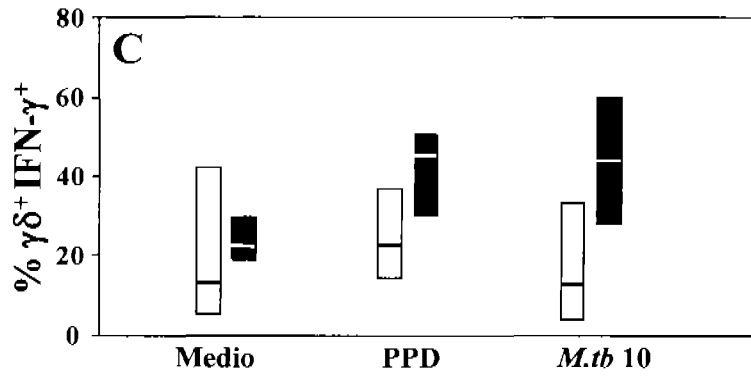
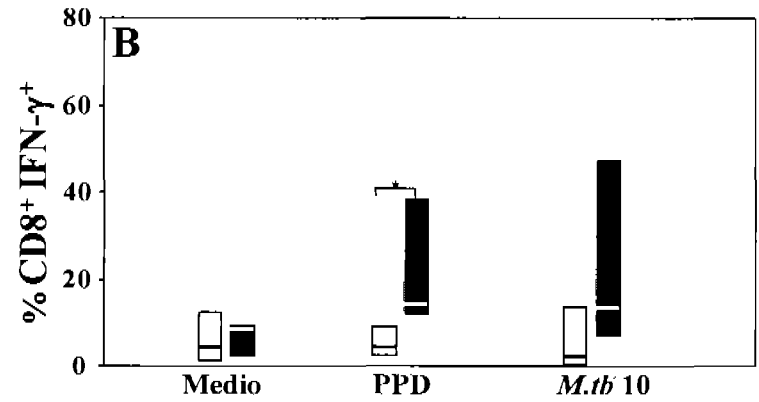
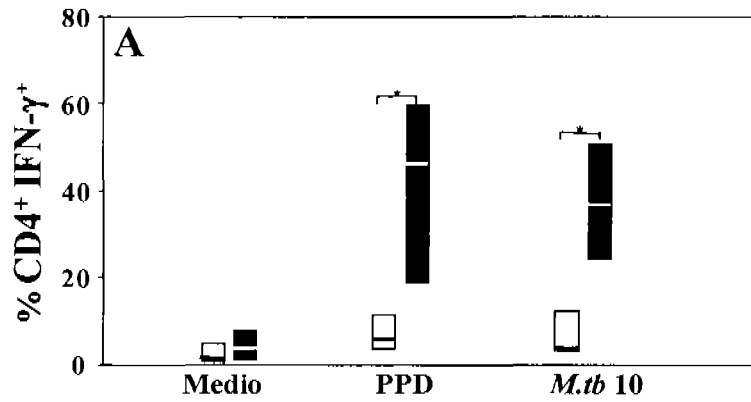


Figura 2. Análisis de las subpoblaciones de linfocitos T alveolares productoras de IFN- γ . Las BAC fueron estimuladas con PPD o infectadas con *M.tuberculosis* (MOI 10) durante 12 hrs. Posteriormente se hizo la tinción de superficie con anti-humano PerCp (anti-CD3, CD4 y CD8) y FITC (anti-CD4, CD8, CD56, TCR $\gamma\delta$ y CD45RO). Después se hizo la tinción intracelular con anti-IFN- γ PE. Se analizaron las células productoras de IFN- γ en la región de los linfocitos (CD3⁺) conforme a CD3⁺ vs. Granularidad (A-D, F) y en tamaño vs. Granularidad (E). **A)** CD4⁺, **B)** CD8⁺ [Sanos n=10, TB n=7], **C)** TCR $\gamma\delta$ ⁺, **D)** CD56⁺, **E)** CD3⁻CD56⁺ [Sanos n=8, TB n=7], **F)** CD45RO/CD4⁺ y CD45RO/CD8⁺ [Sanos n=4, TB n=4], (* p \leq 0.05, Sanos vs. TB, Mann-Whitney U-test). (□ Sanos, ■ TB)

Por otra parte, también se analizó la participación de los linfocitos T alveolares con fenotipo de memoria ($CD45^{+}RO^{+}$) en la producción de IFN- γ en el pulmón ya que la respuesta rápida hacia PPD y *M.tuberculosis* observada en los pacientes con TB sugirió la posibilidad de aumento en la inmunidad por células de memoria a nivel local.

El análisis de los linfocitos alveolares mostró que la proporción de linfocitos T alveolares productores de IFN- γ con fenotipo $CD4^{+}CD45RO^{+}$ y $CD8^{+}CD45RO^{-}$ se encontraron aumentadas significativamente ($p \leq 0.05$) en los pacientes con TB (Figura 2F); a pesar de proporciones similares de $CD4^{+}CD45RO^{+}$ y $CD8^{+}CD45RO^{+}$ en ambos grupos de estudio (Datos no mostrados). Estos resultados apoyan la idea que la inmunidad en el pulmón durante la tuberculosis pulmonar activa está basada en las células efectoras pero que existe una gran participación de las células de memoria.

6.5. Aumento en expresión del gen y la producción de IFN- γ en el compartimiento bronquiolo-alveolar en la TB pulmonar activa.

Los resultados anteriores proporcionaron la información sobre los linfocitos T alveolares productores de IFN- γ en el pulmón, sin embargo, la detección se hizo a nivel intracelular por lo que importante saber si la secreción de la citocina no se encuentra alterada durante la TB pulmonar activa. De manera que el siguiente objetivo fue determinar si la secreción del IFN- γ se encuentra alterada por la infección con *M.tuberculosis* en los pacientes con TB, y con este fin se estudiaron algunas de las vías involucradas en la producción de IFN- γ en las BAC y PBMC de pacientes con TB y sujetos sanos en respuesta a diferentes estímulos.

Para analizar la producción de IFN- γ mediada por el IL-12R o por Ag-específico las BAC y PBMC fueron estimuladas *in vitro* con PPD o infectadas con *M.tuberculosis* viva (MOI

de 10), rhIL-12, rhIL-12+PHA. Se determinó la concentración del IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo por la técnica de ELISA, y además se obtuvieron los respectivos lisados celulares para analizar la expresión del gen por cuantificación del mRNA del IFN- γ mediante PCR cuantitativo en tiempo real.

En la Figura 3A se observa que existe una producción constitutiva de IFN- γ y está aumentada significativamente en las BAC de los pacientes con TB (mediana, ng/ml TB=0.9 vs. sanos=0, $p \leq 0.05$). Después de la estimulación *in vitro* con PPD o la infección con *M.tuberculosis* (MOI de 10) la producción de IFN- γ por las BAC de los pacientes con TB se incrementa significativamente en comparación con las BAC de los sanos (mediana ng/ml TB vs sanos: PPD, 7.4 vs. 0.04, *M.tuberculosis* 10, 4.6 vs. 0.1, $p \leq 0.05$) (Figura 3 A). En contraste con los resultados en las BAC de los pacientes con TB, la producción constitutiva de IFN- γ en las PBMC autólogas fue muy baja (mediana, ng/ml BAC vs. PBMC: 0.9 vs. 0.015, $p \leq 0.05$) (Figura 3C) lo que demuestra que existen diferencias entre la respuesta inmune local y periférica de los pacientes con TB.

Posteriormente, se analizó la producción del IFN- γ mediada por el IL-12R a través de la estimulación con rhIL-12 o en combinación con PHA y se encontró un incremento significativo de la producción de IFN- γ en las BAC de los pacientes con TB en comparación con los sujetos sanos (mediana pg/ml; TB vs sanos; rIL-12, 1.3 vs. 0.06; rIL-12+PHA, 16.5 vs. 1.9, $p \leq 0.05$) (Figura 3A).

A diferencia de los resultados obtenidos en las BAC, la producción constitutiva de IFN- γ en las PBMC fue baja y similar y entre los grupos de estudio (mediana; TB=0.01 y sanos=0.01 pg/ml). Al estudiar el efecto de los diferentes estímulos se observó aumento

en la producción IFN- γ , sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (Figura 3C).

Los resultados mostrados hasta aquí demuestran que las BAC de los pacientes con TB producen constitutivamente IFN- γ y que además tienen la capacidad de producir más citocina en respuesta a diferentes estímulos (específicos y mediados por la IL-12), lo que sugiere que durante la enfermedad la incapacidad para controlar el crecimiento de *M.tuberculosis* al menos no se debe a la falta de IFN- γ que es una citocina importante para el control de infecciones por bacterias intracelulares.

Paralelamente, se hizo el análisis la expresión del gen que codifica el IFN- γ mediante el análisis del número de copias de mRNA y los resultados mostraron que existe mayor expresión constitutiva del gen en las BAC de los pacientes con TB en comparación con los sanos (mediana, no. copias; TB=80 y sanos= 2, $p\leq 0.05$) (Figura 3B). Similar a los resultados obtenidos en la producción de IFN- γ Ag-específico la estimulación *in vitro* con PPD o la infección con *M.tuberculosis* (MOI de 10), causó un incremento significativo en el número de copias de mRNA de IFN- γ en las BAC de los pacientes con TB (mediana, no. copias; TB vs. sanos; PPD, 806 vs. 6, *M.tuberculosis* 10, 488 vs. 10, $p\leq 0.05$), mientras que la estimulación con rhIL-12 y rhIL-12 + PHA mostró un número comparable de copias entre las BAC de los grupos de este estudio. A diferencia de los resultados obtenidos en las BAC, en las PBMC se encontró aumentado significativamente el número de copias de mRNA de IFN- γ en los sujetos sanos en comparación con los pacientes con TB después de la estimulación *in vitro* *M.tuberculosis* 10 o rhIL-12+PHA (Figura 3D).

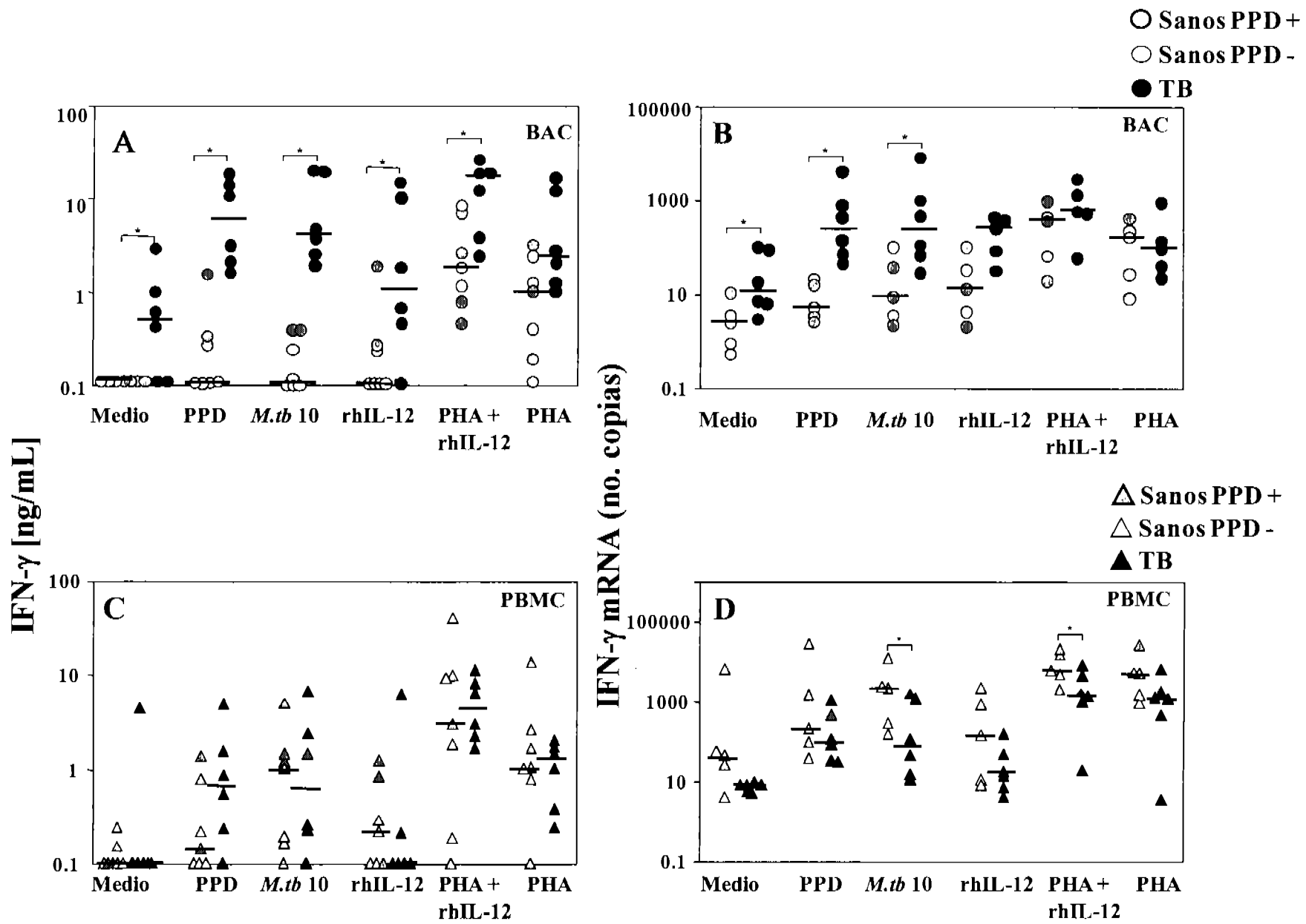


Figura 3. Producción y expresión del gen de IFN- γ en células bronquiolo alveolares (BAC) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las BAC o PBMC fueron estimuladas con PPD, rhIL-12, rhIL-12+ PHA, PHA o infectadas con *M.tuberculosis* (MOI 10) durante 24 hrs y la producción de IFN- γ (proteína) se determinó en los sobrenadantes de cultivo por la técnica de ELISA y los resultados se reportaron en ng/ml. **A)** BAC y **C)** PBMC [Sanos n=7 (PPD⁺=4, PPD⁻=3), TB n=6]. La expresión del gen de IFN- γ se analizó por PCR cuantitativo en tiempo real y los resultados se reportaron en número de copias de mRNA. **B)** BAC y **D)** PBMC [Sanos n=5 (PPD⁺=3, PPD⁻=2), TB n=6], (*p \leq 0.05, Mann-Whitney U-test).

En resumen, los datos demuestran que en los pacientes con TB existe la acumulación local de células que responden específicamente a *M.tuberculosis* y PPD mostrando que tienen la capacidad de producir IFN- γ y además es claro que existen diferencias entre la respuesta inmune local y periférica.

6.6. Producción de IL-12p70 en respuesta a la infección con *M.tuberculosis*. Además de investigar la producción del IFN- γ que constituye una citocina importante en la respuesta inmune tipo Th1 encontrándose aumentada en las BAC de pacientes con TB, también se determinó la presencia de IL-12p70 ya ésta citocina forma parte de la inmunidad innata y promueve la respuesta celular Th1 al ser un fuerte inductor del IFN- γ . En los sobrenadantes de cultivo de las BAC y PBMC se determinó la presencia de IL-12p70 y los resultados de la Figura 4A muestran que después de la infección con *M.tuberculosis* la producción de IL-12p70 está aumentada significativamente ($p \leq 0.05$) en las BAC de los pacientes con TB en comparación con los sujetos sanos mientras que en los sobrenadantes de las PBMC las concentraciones de la citocina son comparables entre los grupos estudio (Figura 4B). Estos resultados siguen apoyando que durante la TB pulmonar activa existe una respuesta inmune celular Th1 (IFN- γ e IL-12p70) en el pulmón. Sin embargo, a pesar de las evidencias de una respuesta protectora (Th1) no existe control en el crecimiento de *M.tuberculosis*.

6.7. Expresión de la subunidad $\beta 1$ y la subunidad $\beta 2$ del RIL-12 en células bronquiolo alveolares y células mononucleares de sangre periférica. Ya que una de las vías involucradas en la producción de IFN- γ es a través del IL-12R, se analizó paralelamente la

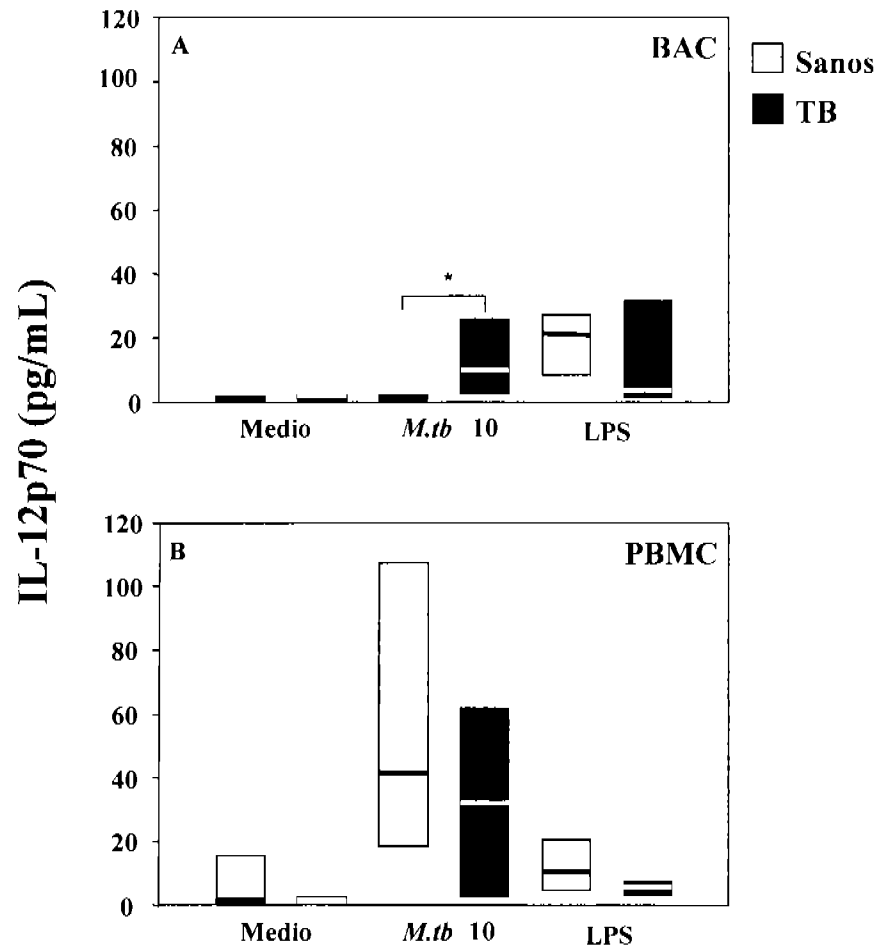


Figura 4. Producción de IL-12p70 por las células bronquiolo alveolares (BAC) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las BAC o PBMC fueron estimuladas con LPS o infectadas con *M.tuberculosis* (MOI 10) durante 24 hrs y la producción de IL-12p70 se determinó en los sobrenadantes de cultivo por Multiplex Bead Array Assay. **A)** BAC [Sanos n=5, TB n=6] y **C)** PBMC [Sanos n=7, TB n=6], (*p<0.05, Mann-Whitney U-test).

expresión del gen de IL-12R (subunidad $\beta 1$ y $\beta 2$) en las BAC y PBMC por PCR cuantitativo en tiempo real. Los resultados mostraron que constitutivamente y después de la estimulación *in vitro* con PPD o la infección con *M.tuberculosis* existe un número similar de copias de mRNA de ambas subunidades del RIL-12 en BAC y PBMC de los grupos de estudio ($p \geq 0.05$) (Figura 5). Sin embargo, es importante mencionar que el análisis de subunidades IL-12R $\beta 1$ y IL-12R $\beta 2$ (proteína) por citometría de flujo mostró aumento en la expresión constitutiva en los linfocitos T alveolares de los pacientes con TB (Figura 10).

6.8. Expresión de IFN- γ R1 en células bronquiolo alveolares y células mononucleares de sangre periférica. Para establecer si durante la TB pulmonar el IFN- γ que se produce localmente participa en la activación del macrófagos, como siguiente paso se analizó la expresión de la subunidad R1 del receptor del IFN- γ (IFN- γ R1) en las BAC y PBMC de los pacientes con TB y sujetos sanos. El número de copias de mRNA del IFN- γ R1 constitutivo y después de la estimulación *in vitro* con PPD, rhIFN- γ , LPS o la infección con *M.tuberculosis* (MOI de 10) fueron similares entre las BAC de los grupos de estudio (Figura 6 A); mientras que en las PBMC de los pacientes con TB la expresión constitutiva de IFN- γ R1 se encontró aumentada significativamente en comparación con sujetos sanos (Figura 6B). Después de la estimulación *in vitro* con PPD o la infección con *M.tuberculosis* el número de copias de mRNA del IFN- γ R1 disminuye respecto a la expresión constitutiva; no se observaron cambios significativos en las PBMC de los sujetos sanos después de la estimulación con PPD, *M.tuberculosis* e IFN- γ (Figura 6B).

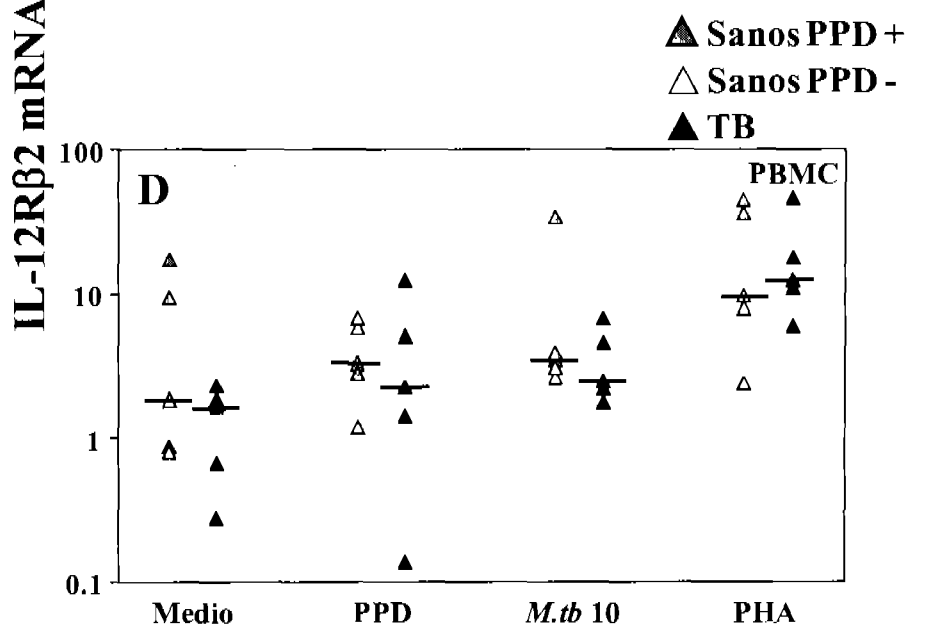
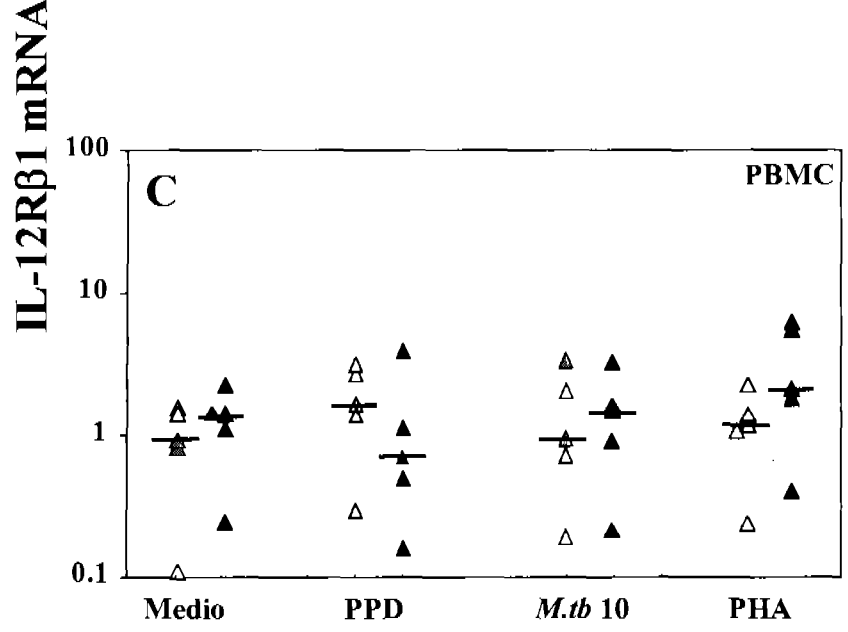
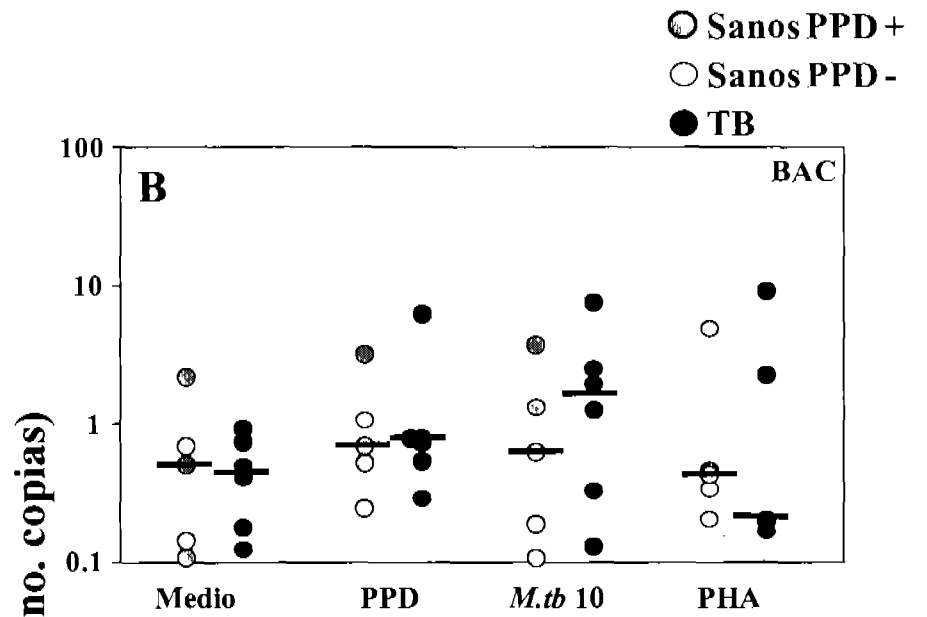
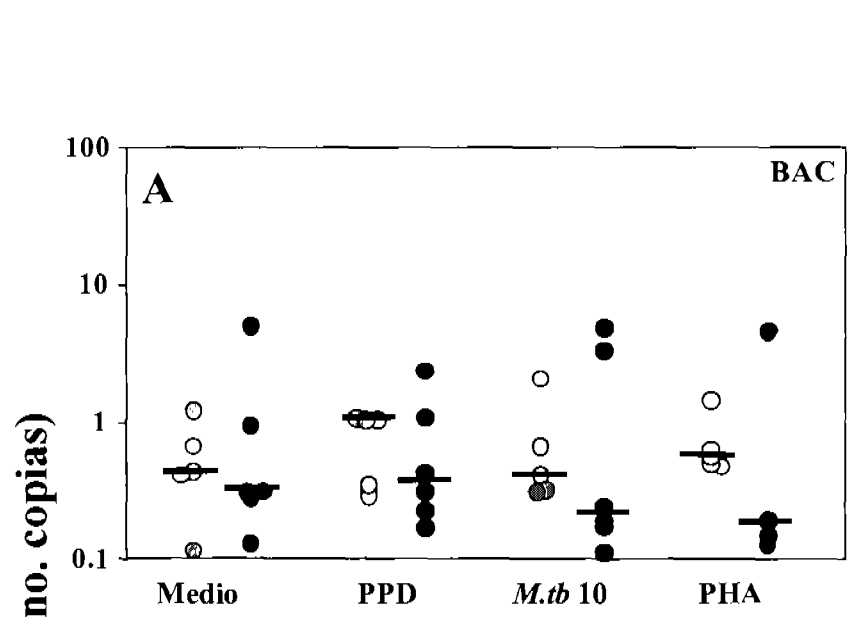


Figura 5. Expresión de la subunidad $\beta 1$ y $\beta 2$ del receptor de la IL-12 en células bronquiolo alveolares (BAC) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las BAC o PBMC fueron estimuladas con PPD, PHA o infectadas con *M.tuberculosis* (MOI 10) durante 24hrs. Se cosecharon los sobrenadantes y las células se lisaron para hacer la extracción de RNA total que se utilizó para la síntesis de cDNA. Se llevó a cabo la amplificación de IL-12R $\beta 1$, IL-12R $\beta 2$ y el gen constitutivo rRNA18S por PCR cuantitativo en tiempo real. Se normalizó con respecto r18S y los resultados se reportaron en número de copias de mRNA. Expresión de IL-12R $\beta 1$: **A)** BAC y **C)** PBMC [Sanos n=5 (PPD+=3, PPD-=2, TB n=6)]. Expresión de IL-12R $\beta 2$: **B)** BAC y **D)** PBMC [Sanos n=5 (PPD+=3, PPD-=2, TB n=6)], (*p \leq 0.05, Mann-Whitney U-test).

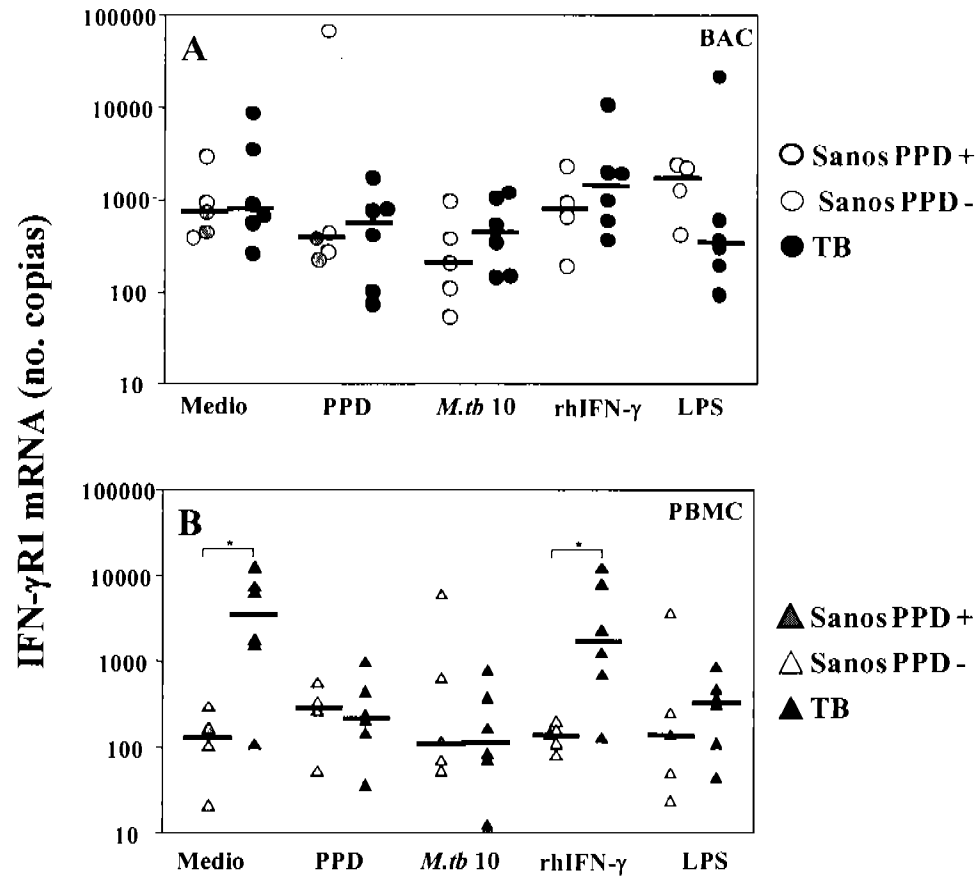


Figura 6. Expresión del IFN- γ R1 en células bronquiolo alveolares (BAC) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las BAC o PBMC se estimularon con PPD, 100U de rhIFN- γ , LPS o se infectaron con *M.tuberculosis* (MOI 10) durante 24 hrs. Se cosecharon los sobrenadantes y las células se lisaron para hacer la extracción de RNA para la síntesis de cDNA. Se hizo la amplificación del r18S y IFN- γ R1 por PCR cuantitativo en tiempo real. Se normalizó con el rRNA 18S y los resultados se reportaron en número de copias de mRNA. **A) BAC, B) PBMC** [Sanos n=5 (PPD+=3, PPD-=2, TB n=6), (* $p \leq 0.05$, Mann-Whitney U-test).

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos decir que en los pacientes con TB a pesar de haber una producción elevada de IFN- γ en el pulmón, esto no incrementa la expresión del IFN- γ R1 sugiriendo que la interacción IFN- γ /IFN- γ no es eficiente y consecuentemente los macrófagos alveolares podrían no activarse por lo que no hay control de la infección.

Para evaluar la activación de los macrófagos mediada por el IFN- γ R y se analizó la expresión y producción de TNF- α en BAC y PBMC de los pacientes con TB y sujetos sanos y no se encontraron diferencias significativas (datos no mostrados). Por lo tanto, concluimos que la interacción IFN- γ /IFN- γ R no es eficiente y en consecuencia los macrófagos alveolares no se activan y la infección persiste.

6.9. Citocinas anti-inflamatorias en sobrenadantes de cultivo y en fluido de lavados bronquiolo alveolares. Con el objetivo de determinar mecanismos que podrían estar regulando la expresión de las citocinas y receptores, se analizó la producción de citocinas involucradas en la supresión de la respuesta inmune hacia *M.tuberculosis* y se determinó la producción de IL-4, IL-9 e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo de BAC y PBMC. Los resultados mostraron que la infección con *M.tuberculosis* incrementa de manera significativa ($p \leq 0.05$) la producción de IL-4 en los sobrenadantes de las BAC de los pacientes con TB comparado con los sanos (Figura 7A), mientras que en las PBMC los resultados fueron comparables entre ambos grupos (Figura 7B). No se encontraron diferencias significativas en la producción de IL-9 e IL-10 entre los grupos de estudio (Figura 8A y 8B). También se analizó la presencia de TGF- β en el líquido de los LBA y se encontraron niveles aumentados en los pacientes con TB ($p \geq 0.05$) (Figura 8C).

El aumento de IL-4, IL-9 y TGF- β sugiere el desarrollo de una respuesta inmune anti-inflamatoria a nivel pulmonar que pudiera neutralizar el efecto del IFN- γ por lo que no hay control de la infección.

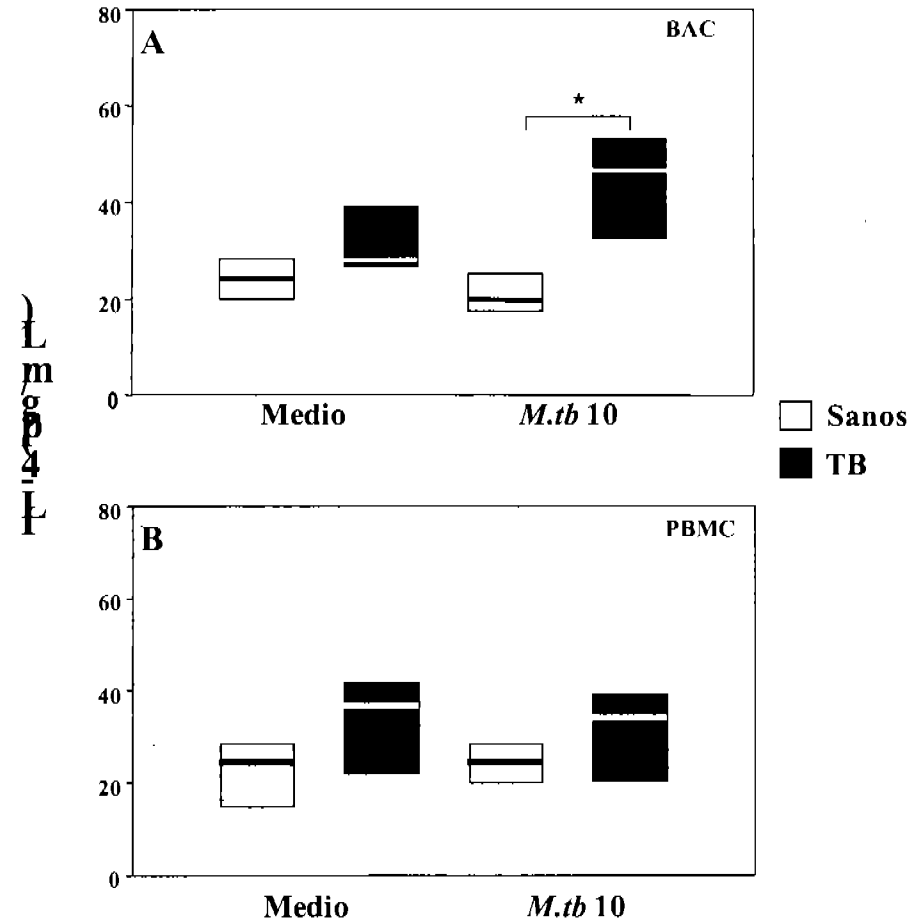


Figura 7. Producción de IL-4 en células bronquiolo alveolares (BAC) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las BAC o PBMC fueron infectadas con *M.tuberculosis* (MOI de 10) durante 24 hrs. En los sobrenadantes de cultivo se determinó la producción de IL-4 por Multiplex Bead Array Assay y los datos son reportados en pg/ml. **A)** BAC [Sanos, n=5; TB, n=6] y **B)** PBMC [Sanos, n=7; TB, n=6], (TB vs. Sanos, * $p \leq 0.05$, Mann-Whitney U-test).

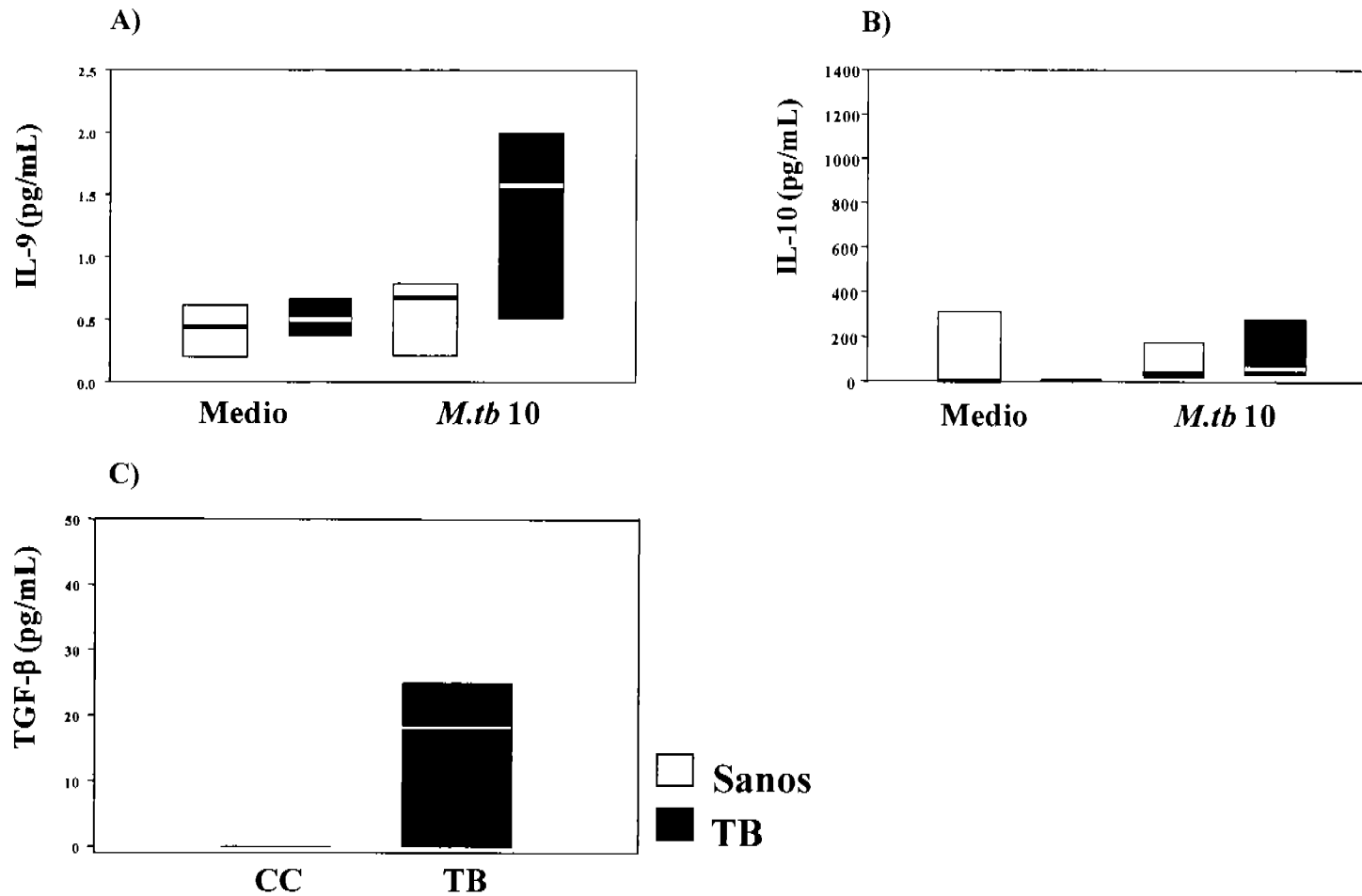


Figura 8. Producción de IL-9 e IL-10 por células bronquiolo alveolares y presencia de TGF-β en LBA. Las BAC fueron infectadas con *M.tuberculosis* (MOI de 10) durante 24 hrs y en los sobrenadantes de cultivo se determinaron las citocinas IL-9 e IL-10 por Multiplex Bead Array Assay; mientras que el TGF-β se determinó en el LBA por la técnica de ELISA. Los datos fueron reportados en pg/ml. **A)** IL-9, **B)** IL-10 y **C)** TGF-β (Sanos, n=5; TB, n=6).

7. DISCUSIÓN.

La TB es una enfermedad que sigue representando un problema de salud pública a nivel mundial y a pesar de existir un profundo conocimiento sobre la inmunopatogenia de la enfermedad, aún existen aspectos que son objeto de estudio.

Con la finalidad de profundizar en el conocimiento sobre la respuesta durante la TB pulmonar activa en humanos a nivel local en el presente estudio se analizó la producción de citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ , IL-12, TNF- α y citocinas anti-inflamatoria como IL-4, IL-9, IL-10, TGF- β y la expresión del mRNA de IFN- γ , IL-12R β 1, IL-12R β 2, IFN- γ R1 y TNF- α en las BAC de los pacientes con TB pulmonar activa provenientes de las zonas afectadas del pulmón.

Al analizar las poblaciones celulares provenientes del pulmón de los pacientes con TB pulmonar activa y sujetos sanos se encontraron diferencias en la composición celular ya que los pacientes con TB tienen aumentados los linfocitos y neutrófilos (Tabla 1). Estos datos proporcionan evidencias de la compartimentalización de las células inflamatorias del sistema inmune hacia el sitio de infección durante la TB pulmonar activa humana. Sin embargo, la respuesta inmune que se desarrolla no solamente es el resultado de la migración de células al sitio de infección causando un incremento de linfocitos T, sino que además, existe un aumento en la capacidad de respuesta de estos linfocitos T alveolares a través de la producción de citocinas como el IFN- γ durante la enfermedad.

También los resultados mostraron que los pacientes con TB tienen una mayor proporción de linfocitos T alveolares respecto a los sujetos sanos (Sanos 5% vs TB 15%, $p \leq 0.05$); y de esta población el 70% corresponde a los linfocitos T alveolares CD4⁺, de los que más del 46% producen IFN- γ al ser estimulados *in vitro* con PPD y *M.tuberculosis* viva. Estos

resultados demuestran que los linfocitos alveolares T CD4⁺ específicos a *M.tuberculosis* componen la fuente principal de IFN- γ a nivel local durante la TB pulmonar activa. Por otra parte, se encontró que los linfocitos alveolares CD8⁺, TCR $\gamma\delta$ ⁺, CD3⁺CD56⁻ y las células NK son poblaciones celulares que también contribuyen a la producción del IFN- γ Ag-específico a nivel local, aunque en menor grado en comparación con los linfocitos alveolares T CD4⁺. Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con un estudio previo en el que se demostró la producción elevada de IFN- γ por los linfocitos alveolares CD4⁺ en LBA de pacientes con TB después de la estimulación con PPD en comparación con las células de sangre periférica autólogas (103). Sin embargo, nuestros resultados difieren con lo reportado por Taha y cols. (78) quienes demostraron un aumento en la proporción de linfocitos alveolares T CD8⁺ que expresan constitutivamente el mRNA del IFN- γ en pacientes con TB. Es posible que las diferencias entre los resultados sean debidas a el grado de avance de la TB en los pacientes estudiados y además en las metodologías experimentales utilizadas, ya que en el presente estudio las poblaciones productoras de IFN- γ se caracterizaron por citometría de flujo basándonos en los marcadores de superficie específicos mientras que ellos lo hicieron por hibridación *in situ* (78).

Por otro lado, se analizó la proporción de linfocitos alveolares de memoria productores de IFN- γ y se encontraron aumentados significativamente tanto los CD4⁺CD45RO⁺ y los CD8⁺CD45RO⁺ en las BAC de los pacientes con TB en comparación con los sujetos sanos. Estos resultados son consistentes con el incremento en la producción de IFN- γ Ag-específico (*M.tuberculosis* y PPD) y rápida respuesta (24 hrs post estimulación) observada en las BAC de los pacientes con TB.

Hasta aquí los resultados obtenidos con las BAC de los pacientes con TB proporcionan evidencias de la compartimentalización de células inflamatorias como los neutrófilos y linfocitos T alveolares (Tabla 1 y 2) y la producción de IFN- γ constitutiva e inducida por Ag's-específicos de *M.tuberculosis* que es paralela a la proporción de linfocitos T alveolares activados (mediana 45% de CD69⁺) en el sitio de la infección.

Por otra parte, con la finalidad de definir el tipo de respuesta inmune desarrollada en el sitio de infección durante la TB se estudió la producción de la IL-12p70 (forma activa) ya que forma parte la respuesta inmune tipo Th1 y se encontraron niveles elevados en los sobrenadantes de las BAC pacientes con TB en respuesta a la infección con la cepa viva de *M.tuberculosis*. Este resultado correlaciona con el aumento en la producción de IFN- γ a nivel local y sugiere la activación de los macrófagos y/o células dendríticas inducida por la infección con *M.tuberculosis* en los espacios bronquiolo alveolares, ya que estas poblaciones celulares son productoras de IL-12p70 al ser activadas. Esta información coincide con los niveles elevados de IL-12p70 descrita en el fluido de LBA de pacientes con TB pulmonar (104) y además con un reporte en donde se demostró aumento en los niveles de IL-12p40 en líquido pleural en de pacientes con TB pleural comparación con los niveles en sueros autólogos (105).

La IL-12p70 en la respuesta protectora a la infección de *M.tuberculosis* tiene un papel primordial ya que promueve el desarrollo de una respuesta celular Th1 al ser un potente inductor del IFN- γ ; además favorece la diferenciación de los linfocitos CD4⁺, la activación de los linfocitos citotóxicos y células NK (35), de manera que los resultados del presente estudio que muestran el aumento en la producción de la IL-12p70 e IFN- γ

por las BAC de los pacientes con TB son evidencias del desarrollo de una respuesta inmune tipo Th1.

No obstante, a pesar de las evidencias de una respuesta inmune celular tipo Th1 en los espacios bronquiolo alveolares durante la TB pulmonar activa, no hay control del crecimiento de *M.tuberculosis* demostrada por la presencia de micobacterias viables en las vías respiratorias de los pacientes con TB pulmonar activa sin tratamiento, lo que hace pensar que probablemente existe algún componente de la respuesta inmune alterado por efecto de la infección. De manera que para discernir la existencia de alguna alteración en la respuesta inmune durante la enfermedad adicionalmente se analizó la expresión constitutiva e inducida (por estimulación con PPD o *M.tuberculosis*) de los receptores IL-12R β 1, IL-12R β 2 e IFN- γ R1 que son componentes importantes de la respuesta inmune tipo Th1.

Primero, abordamos el estudio del receptor de IL-12 (IL-12R) considerando que como parte de la inmunidad innata hay producción de la IL-12p70 por las células dendríticas, los monocitos y macrófagos en respuesta a la infección con *M.tuberculosis* y para que esta citocina tenga su efecto biológico se requiere de la interacción con su receptor específico IL-12R (36). Previamente se demostró que la infección de las BAC con *M.tuberculosis* causó una producción aumentada de IL-12p70 en BAC de pacientes con TB pulmonar activa (Figura 4A) con lo se descartó que la falla en la respuesta inmune durante la TB activa reflejada por la falta de control de *M.tuberculosis* se deba a una producción deficiente de IL-12, sin embargo, existe la posibilidad que su receptor o la interacción con éste se encuentren alterados por lo se procedió al estudio del receptor de la IL-12 (IL-12R).

Se analizó la expresión del IL-12R y los resultados mostraron aumento significativo ($p \leq 0.05$) en la expresión constitutiva de mRNA de IL-12R β 1 y IL-12R β 2 en las BAC de los pacientes con TB (Figura 9) que coincidieron con los datos de citometría de flujo para IL-12R β 1 (Figura 10) teniendo una correlación con el aumento de IL-12p70 e IFN- γ en los pacientes con TB activa. Sin embargo, con la finalidad de comparar el mismo número de linfocitos entre los pacientes con TB y sujetos sanos (los pacientes con TB tienen 3 veces más linfocitos T alveolares) se hizo una normalización y no se encontraron diferencias significativas en la expresión del mRNA para IL-12R (Figura 5).

En este trabajo no se precisó el fenotipo de las subpoblaciones de linfocitos T alveolares que expresan el IL-12R, sin embargo, podríamos especular que son los linfocitos alveolares CD4⁺ ya que se encuentran en mayor proporción en el pulmón (Tabla 1) y están activados (CD69⁺) (Figura 1), considerando que este receptor se expresa solamente en los linfocitos T activados.

Estudios previos de Taha y colaboradores (106) demostraron *ex vivo* el incremento de IL-12R β 1 e IL-12R β 2 en linfocitos alveolares T CD8⁺ de pacientes con TB pulmonar activa; sin embargo, sus datos no fueron normalizados considerando la alveolitis linfocítica que típicamente presentan los pacientes con TB.

Por otra parte, los resultados muestran que la inducción y la liberación del IFN- γ en las BAC de los pacientes con TB se llevan a cabo eficientemente de manera que el crecimiento no controlado de *M.tuberculosis* en los espacios bronquiolo alveolares durante la TB pulmonar activa no se debe a la falta de IFN- γ en el pulmón pues se ha demostrado que su producción inducida por los antígenos micobacterianos (Ag-específico) o a través del RIL-12 están intactos y funcionales en los pacientes con TB.

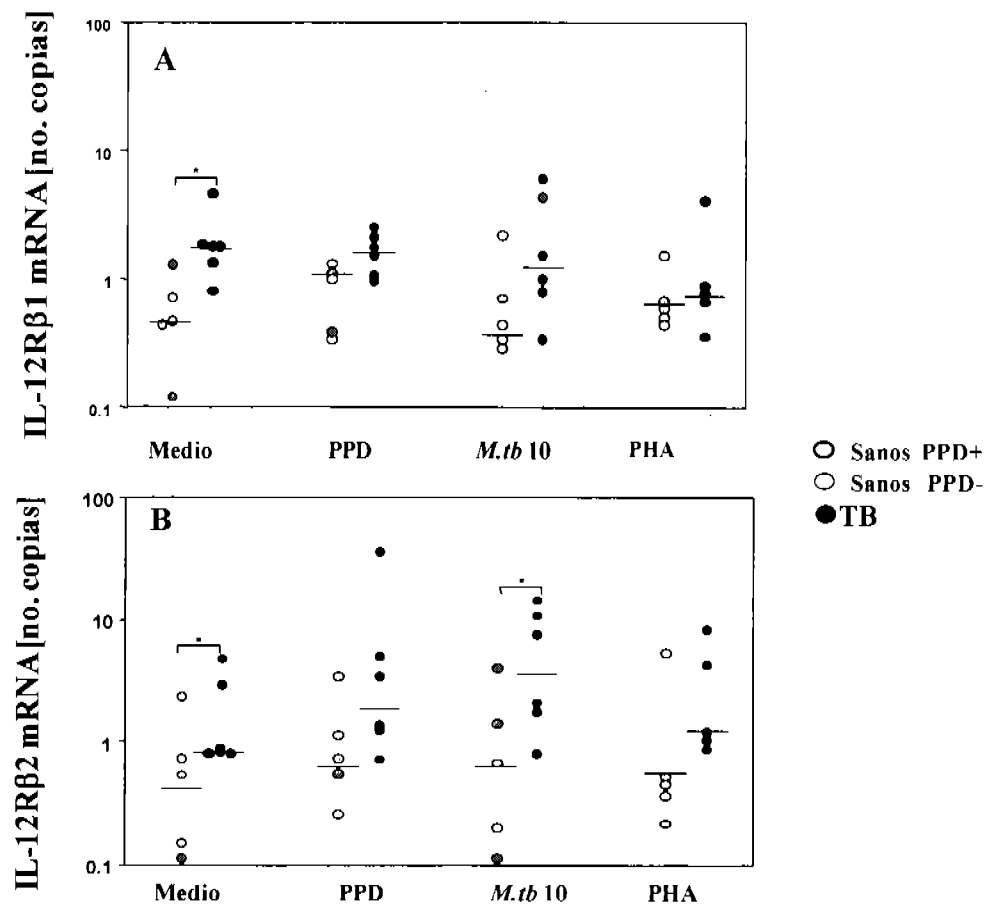


Figura 9. Expresión de la subunidad $\beta 1$ y $\beta 2$ del receptor de IL-12 en células bronquiolos alveolares sin ajustar el número de linfocitos T. Las BAC fueron estimuladas con PPD o PHA infectadas con *M.tuberculosis* (MOI 10) durante 24 hrs. Se hizo la amplificación del rRNA 18S, IL-12R $\beta 1$ e IL-12R $\beta 2$ por PCR cuantitativo en tiempo real y se reportó en número de copias de mRNA. **A)** IL-12R $\beta 1$, **B)** IL-12R $\beta 2$ [Sanos n=5 (PPD+=3, PPD-=2, TB n=6), (Sanos vs. TB, *p \leq 0.05, Mann-Whitney U-test).

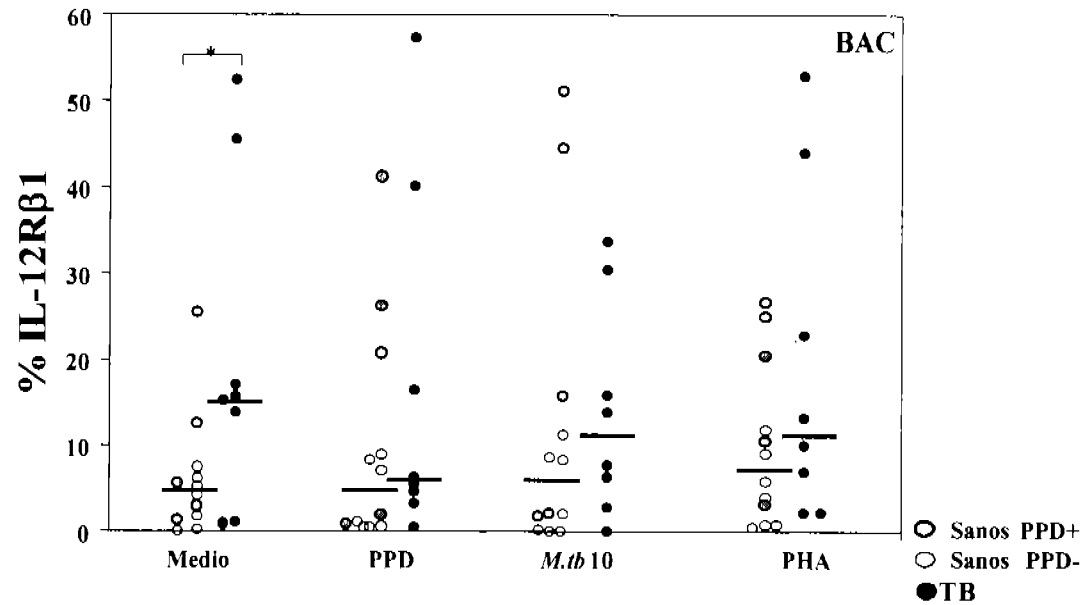


Figura 10. Detección de la IL-12Rβ1 en células bronquiolo alveolares. Las BAC fueron estimuladas con PPD, PHA o infectadas con *M.tuberculosis* (MOI 10) durante 24hrs. Se recuperaron las células y se hizo la tinción de superficie con CD3PerCp y IL-12Rβ1PE después se analizó la región de linfocitos (CD3⁺) de acuerdo a CD3⁺ vs Granularidad. Los resultados se reportaron en porcentaje. [Sanos n=12 (PPD+=7, PPD-=5, TB n=8), (*p≤0.05, Mann-Whitney U-test).

Entonces, los resultados en conjunto orientaron a especular que a pesar de la presencia de IFN- γ a nivel local posiblemente la falta de respuesta para controlar la infección causada por *M.tuberculosis* puede deberse a la falta de activación de los macrófagos alveolares reflejándose en su incapacidad para controlar el crecimiento de la micobacteria mostrado por la persistencia de la enfermedad.

Reportes previos coinciden con nuestras observaciones, ya que estudios realizados en los contactos sanos de pacientes con TB demostraron que los niveles de IFN- γ en los cocultivos de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ con macrófagos alveolares infectados con *M.tuberculosis* no correlacionan con el control del crecimiento de la micobacteria mediado por linfocitos T (107). Además, también se ha demostrado que el tratamiento de pacientes con TB multi-resistente con IFN- γ en aerosol, no causa la eliminación completa de la micobacteria, observándose solamente efectos transitorios en su crecimiento (108).

Así, que aunque el IFN- γ es un activador de los macrófagos para mediar la muerte de *M.tuberculosis*, los mecanismos protectores anti-micobacterianos inducidos por IFN- γ parecen estar alterados en los pacientes con TB pulmonar activa.

Dado que el IFN- γ necesita interaccionar con su receptor específico (IFN- γ R) para tener efecto biológico sobre el macrófago también se estudió la expresión de IFN- γ R1 (mRNA) en los macrófagos alveolares y no se observaron diferencias entre los grupos de estudio (Figura 6A). Estos resultados fueron sorprendentes ya que con los resultados previos que mostraron aumento en la producción de IL-12p70 e IFN- γ en las BAC de los pacientes con TB pulmonar activa, se esperaba que el microambiente alveolar favoreciera el incremento en la expresión del receptor (IFN- γ R) en los macrófagos alveolares dándose

la interacción con el IFN- γ producido localmente y en consecuencia se llevara a cabo una activación eficiente de los macrófagos alveolares.

Al no encontrarse diferencias en la expresión del IFN- γ R1 entre los grupos de estudio se puede especular que la incapacidad para controlar la infección por *M.tuberculosis* mostrada por los pacientes con TB quizá se debe a la falta de activación en los macrófagos dependiente del IFN- γ . Esto puede ser apoyado por un reporte reciente donde se ha mostrado que existe una expresión reducida de IFN- γ R1 en las PBMC de los pacientes con TB sin tratamiento siendo esto revertido con la terapia anti-TB (49).

Con el propósito de tener más evidencias sobre la activación de los macrófagos se evaluó la expresión de mRNA y la producción constitutiva e inducida de TNF- α como evidencia de activación de los macrófagos mediada por el IFN- γ /IFN- γ R en las BAC de los pacientes con TB activa y los sujetos sanos. Los resultados no mostraron diferencias entre los grupos de estudio (resultados no mostrados) y correlacionaron con los datos sobre la expresión de mRNA del IFN- γ R1 apoyando que los pacientes con TB pulmonar activa muestran una falta de activación de los macrófagos alveolares a pesar de la presencia de IFN- γ local.

La repercusión biológica de la activación deficiente de los macrófagos no solamente implica la incapacidad para destruir a la micobacteria, sino a nivel de la producción de citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α representa la incapacidad del sistema inmune para impedir la propagación de la infección mediante la formación del granuloma (2).

La aparente falla para controlar el crecimiento de *M.tuberculosis* durante la TB activa puede deberse a la presencia de citocinas anti-inflamatorias a nivel local, o bien, a mecanismos de evasión de la respuesta inmune por parte de *M.tuberculosis*.

Considerando que la producción de citocinas anti-inflamatorias en el sitio de la infección puede modular y antagonizar los efectos anti-micobacterianos inducidos por el IFN- γ sobre la activación de los macrófagos alveolares entonces se analizó la producción de algunas citocinas observándose un incremento significativo de la IL-4 en los sobrenadantes de cultivo de BAC de los pacientes con TB (Figura 7) que coincide con hallazgos previos en las BAC de pacientes con TB (73, 109, 110) además también se encontraron aumentadas IL-10, TGF- β e IL-9 (Figura 8).

El análisis de las citocinas demostró que las BAC de los pacientes infectadas con *M.tuberculosis* pueden producir IFN- γ e IL-12, sin embargo, también se demostró que existe la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-4 y TGF- β que pueden contribuir a la falta de control de la infección al suprimir la respuesta a IFN- γ y probablemente también se encuentren implicadas las células T reguladoras, sin embargo no fueron objeto de este estudio.

Los hallazgos sobre el incremento en la producción de IL-4 en BAC de pacientes con TB pulmonar activa junto con los reportes previos (110-114) muestran la existencia de mecanismos inmuno-supresores que interfieren localmente en el control del crecimiento de *M.tuberculosis*, siendo estos la causa o la consecuencia de la TB. Estos resultados sugieren la participación de mecanismos inmuno-supresores en el pulmón a través de la producción de citocinas anti-inflamatorias que pueden jugar un papel importante en el control de un proceso inflamatorio exacerbado tratando de evitar el daño al tejido, sin embargo, esta situación puede ser aprovechada por *M.tuberculosis* para sobrevivir.

Por otra parte, a pesar de las evidencias de la inmunidad Th1 en el pulmón la falta de control del crecimiento de *M.tuberculosis* durante la infección sugiere que la liberación

de IFN- γ a nivel local por los linfocitos alveolares T CD4⁺ y CD8⁺ y la producción de IL-12 no son suficientes para conferir inmunidad protectora. Probablemente otras moléculas, tipos celulares y/o mecanismos moleculares son requeridos para conferir la protección inmunológica.

Existen otros mecanismos inmunosupresores (promotores del crecimiento de *M.tuberculosis*) como son las células T reguladoras en el compartimiento bronquiolo alveolar durante la infección con *M.tuberculosis* (115). También, se ha demostrado que *M.tuberculosis* o sus Ag's pueden alterar directamente la funcionalidad de los macrófagos o la expresión de moléculas importantes para la interacción celular que lleva al desarrollo de una respuesta inmune que permita controlar la infección. Por ejemplo *M.tuberculosis* causa reducción en la expresión de moléculas CD1 (116, 117) y genes inducidos por IFN- γ como CD64 (FcR1) en células THP1 (118); también inhibe la producción de IL-12 y la vía de presentación mediada por MHC II en los macrófagos humanos (24, 25, 45, 46, 119-121).

El presente estudio aporta nuevos conocimientos sobre la inmunidad desarrollada en los espacios bronquiolo alveolares que son el sitio de infección durante la TB pulmonar activa en humanos y pone en evidencia las diferentes poblaciones celulares que participan en la respuesta inmune en el pulmón, ya que este análisis nos puede dar más conocimiento sobre esta enfermedad.

En conclusión, la respuesta funcional de las células del sistema inmune de los pacientes con TB pulmonar activa hacia *M.tuberculosis* en el compartimiento bronquiolo alveolar parece estar intacto con respecto a la inducción, producción y liberación del IFN- γ e IL-12 y difiere de la respuesta en el compartimiento sistémico autólogo.

8. CONCLUSIONES.

Durante la tuberculosis pulmonar activa en humanos.

- 1) Hay compartimentalización de linfocitos T y neutrófilos al espacio bronquiolo alveolar.
- 2) Los linfocitos alveolares T CD4⁺ están aumentados y son la principal fuente de IFN- γ en el pulmón, aunque existe contribución por otras poblaciones celulares (CD8⁺, TCR $\gamma\delta$ ⁺, CD3⁺CD56⁻, CD3⁺CD56⁺).
- 3) Existe una participación importante de los linfocitos alveolares T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria (CD45RO⁺) en la producción de IFN- γ .
- 4) La producción de IFN- γ mediada por antígenos micobacterianos (PPD, *M.tuberculosis*) y por el IL-12R se encuentran intactos y funcionales.
- 5) Hay producción de citocinas pro-inflamatorias (IFN- γ e IL-12p70) y anti-inflamatorias (IL-4 y TGF- β) en el espacio bronquiolo alveolar.
- 6) El análisis de la expresión de los receptores (IL-12R e IFN- γ R) no mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio.
- 7) La producción de TNF- α como medida de activación de los macrófagos no mostró diferencias entre los grupos de estudio, lo que sugiere que los mecanismos de regulación en el pulmón inhiben la expresión del IFN- γ R causando una activación deficiente de los macrófagos alveolares que se traduce en la falta de control del crecimiento de *M.tuberculosis*.
- 8) Existen diferencias en la respuesta inmune a nivel local y sistémico en los pacientes con TB pulmonar activa.

9. BIBLIOGRAFIA.

1. Corbett, E. L., C. J. Watt, N. Walker, D. Maher, B. G. Williams, M. C. Raviglione, and C. Dye. 2003. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* 163:1009-1021.
2. Iliopoulos, A., K. Psathakis, S. Aslanidis, L. Skagias, and P. P. Sfikakis. 2006. Tuberculosis and granuloma formation in patients receiving anti-TNF therapy. *Int J Tuberc Lung Dis* 10:588-590.
3. Jeon, C. Y., and M. B. Murray. 2008. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: a systematic review of 13 observational studies. *PLoS Med* 5:e152.
4. 2008. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing: WHO report 2008. *WHO/HTM/TB/2008.393*
5. Balasubramanian, V., E. H. Wiegshaas, B. T. Taylor, and D. W. Smith. 1994. Pathogenesis of tuberculosis: pathway to apical localization. *Tuber Lung Dis* 75:168-178.
6. Ravikumar, M., V. Dheenadhayalan, K. Rajaram, S. S. Lakshmi, P. P. Kumaran, C. N. Paramasivan, K. Balakrishnan, and R. M. Pitchappan. 1999. Associations of HLA-DRB1, DQB1 and DPB1 alleles with pulmonary tuberculosis in south India. *Tuber Lung Dis* 79:309-317.
7. Stienstra, Y., W. T. van der Graaf, G. J. te Meerman, T. H. The, L. F. de Leij, and T. S. van der Werf. 2001. Susceptibility to development of Mycobacterium ulcerans disease: review of possible risk factors. *Trop Med Int Health* 6:554-562.
8. Figueiredo, J. F., L. Rodrigues Mde, N. H. Deghaide, and E. A. Donadi. 2008. HLA profile in patients with AIDS and tuberculosis. *Braz J Infect Dis* 12:278-280.
9. White, J. H. 2008. Vitamin D signaling, infectious diseases, and regulation of innate immunity. *Infect Immun* 76:3837-3843.
10. Uitterlinden, A. G., Y. Fang, J. B. Van Meurs, H. A. Pols, and J. P. Van Leeuwen. 2004. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 338:143-156.
11. Vannberg, F. O., S. J. Chapman, C. C. Khor, K. Tosh, S. Floyd, D. Jackson-Sillah, A. Crampin, L. Sichali, B. Bah, P. Gustafson, P. Aaby, K. P. McAdam, O. Bah-Sow, C. Lienhardt, G. Sirugo, P. Fine, and A. V. Hill. 2008. CD209 genetic polymorphism and tuberculosis disease. *PLoS ONE* 3:e1388.
12. Barreiro, L. B., O. Neyrolles, C. L. Babb, L. Tailleux, H. Quach, K. McElreavey, P. D. Helden, E. G. Hoal, B. Gicquel, and L. Quintana-Murci. 2006. Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene CD209 is associated with tuberculosis. *PLoS Med* 3:e20.
13. Nicod, L. P. 2007. Immunology of tuberculosis. *Swiss Med Wkly* 137:357-362.
14. Schluger, N. W. 2001. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. *Respir Res* 2:157-163.
15. Cook, D. N., D. S. Pisetsky, and D. A. Schwartz. 2004. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 5:975-979.
16. Fieschi, C., S. Dupuis, E. Catherinot, J. Feinberg, J. Bustamante, A. Breiman, F. Altare, R. Baretto, F. Le Deist, S. Kayal, H. Koch, D. Richter, M. Brezina, G.

- Aksu, P. Wood, S. Al-Jumaah, M. Raspall, A. J. Da Silva Duarte, D. Tuerlinckx, J. L. Virelizier, A. Fischer, A. Enright, J. Bernhoft, A. M. Cleary, C. Vermylen, C. Rodriguez-Gallego, G. Davies, R. Blutters-Sawatzki, C. A. Siegrist, M. S. Ehlayel, V. Novelli, W. H. Haas, J. Levy, J. Freihorst, S. Al-Hajjar, D. Nadal, D. De Moraes Vasconcelos, O. Jeppsson, N. Kutukculer, K. Freceerova, I. Caragol, D. Lammas, D. S. Kumararatne, L. Abel, and J. L. Casanova. 2003. Low penetrance, broad resistance, and favorable outcome of interleukin 12 receptor beta1 deficiency: medical and immunological implications. *J Exp Med* 197:527-535.
17. Filipe-Santos, O., J. Bustamante, A. Chapgier, G. Vogt, L. de Beaucoudrey, J. Feinberg, E. Jouanguy, S. Boisson-Dupuis, C. Fieschi, C. Picard, and J. L. Casanova. 2006. Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol* 18:347-361.
 18. van Crevel, R., T. H. Ottenhoff, and J. W. van der Meer. 2002. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 15:294-309.
 19. Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 16:463-496.
 20. Ernst, J. D. 1998. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 66:1277-1281.
 21. Collins, H. L., and S. H. Kaufmann. 2001. The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunology* 103:1-9.
 22. Medzhitov, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449:819-826.
 23. Pecora, N. D., A. J. Gehring, D. H. Canaday, W. H. Boom, and C. V. Harding. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* LprA is a lipoprotein agonist of TLR2 that regulates innate immunity and APC function. *J Immunol* 177:422-429.
 24. Gehring, A. J., K. M. Dobos, J. T. Belisle, C. V. Harding, and W. H. Boom. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* LprG (Rv1411c): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol* 173:2660-2668.
 25. Gehring, A. J., R. E. Rojas, D. H. Canaday, D. L. Lakey, C. V. Harding, and W. H. Boom. 2003. The *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-regulated HLA-DR and Fc gamma R1 on human macrophages through Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 71:4487-4497.
 26. Zhang, Y., M. Broser, H. Cohen, M. Bodkin, K. Law, J. Reibman, and W. N. Rom. 1995. Enhanced interleukin-8 release and gene expression in macrophages after exposure to *Mycobacterium tuberculosis* and its components. *J Clin Invest* 95:586-592.
 27. Jones, B. W., T. K. Means, K. A. Heldwein, M. A. Keen, P. J. Hill, J. T. Belisle, and M. J. Fenton. 2001. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J Leukoc Biol* 69:1036-1044.
 28. Jung, S. B., C. S. Yang, J. S. Lee, A. R. Shin, S. S. Jung, J. W. Son, C. V. Harding, H. J. Kim, J. K. Park, T. H. Paik, C. H. Song, and E. K. Jo. 2006. The mycobacterial 38-kilodalton glycolipoprotein antigen activates the mitogen-activated protein kinase pathway and release of proinflammatory cytokines through Toll-like receptors 2 and 4 in human monocytes. *Infect Immun* 74:2686-2696.

29. Selsted, M. E., and A. J. Ouellette. 2005. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 6:551-557.
30. Rivas-Santiago, B., S. K. Schwander, C. Sarabia, G. Diamond, M. E. Klein-Patel, R. Hernandez-Pando, J. J. Ellner, and E. Sada. 2005. Human {beta}-defensin 2 is expressed and associated with *Mycobacterium tuberculosis* during infection of human alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 73:4505-4511.
31. Rivas-Santiago, B., J. C. Contreras, E. Sada, and R. Hernandez-Pando. 2008. The potential role of lung epithelial cells and beta-defensins in experimental latent tuberculosis. *Scand J Immunol* 67:448-452.
32. Yu, J., N. Mookherjee, K. Wee, D. M. Bowdish, J. Pistollic, Y. Li, L. Rehaume, and R. E. Hancock. 2007. Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1beta, augments immune responses by multiple pathways. *J Immunol* 179:7684-7691.
33. Rivas-Santiago, B., E. Sada, R. Hernandez-Pando, and V. Tsutsumi. 2006. [Antimicrobial peptides in the innate immunity of infectious diseases]. *Salud Publica Mex* 48:62-71.
34. Rivas-Santiago, B., R. Hernandez-Pando, C. Carranza, E. Juarez, J. L. Contreras, D. Aguilar-Leon, M. Torres, and E. Sada. 2008. Expression of cathelicidin LL-37 during *Mycobacterium tuberculosis* infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. *Infect Immun* 76:935-941.
35. Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3:133-146.
36. Fulton, S. A., J. M. Johnsen, S. F. Wolf, D. S. Sieburth, and W. H. Boom. 1996. Interleukin-12 production by human monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis*: role of phagocytosis. *Infect Immun* 64:2523-2531.
37. Hirsch, C. S., Z. Toossi, C. Othieno, J. L. Johnson, S. K. Schwander, S. Robertson, R. S. Wallis, K. Edmonds, A. Okwera, R. Mugerwa, P. Peters, and J. J. Ellner. 1999. Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. *J Infect Dis* 180:2069-2073.
38. Torres, M., T. Herrera, H. Villareal, E. A. Rich, and E. Sada. 1998. 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*. *Infect Immun* 66:176-180.
39. Song, C. H., H. J. Kim, J. K. Park, J. H. Lim, U. O. Kim, J. S. Kim, T. H. Paik, K. J. Kim, J. W. Suhr, and E. K. Jo. 2000. Depressed interleukin-12 (IL-12), but not IL-18, production in response to a 30- or 32-kilodalton mycobacterial antigen in patients with active pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 68:4477-4484.
40. Sadek, M. I., E. Sada, Z. Toossi, S. K. Schwander, and E. A. Rich. 1998. Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. In *Am J Respir Cell Mol Biol*. 513-521.
41. Hirsch, C. S., R. Hussain, Z. Toossi, G. Dawood, F. Shahid, and J. J. Ellner. 1996. Cross-modulation by transforming growth factor beta in human tuberculosis: suppression of antigen-driven blastogenesis and interferon gamma production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3193-3198.

42. Hirsch, C. S., T. Yoneda, L. Averill, J. J. Ellner, and Z. Toossi. 1994. Enhancement of intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes by transforming growth factor-beta 1. *J Infect Dis* 170:1229-1237.
43. Sturgill-Koszycki, S., P. H. Schlesinger, P. Chakraborty, P. L. Haddix, H. L. Collins, A. K. Fok, R. D. Allen, S. L. Gluck, J. Heuser, and D. G. Russell. 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263:678-681.
44. Deretic, V., and R. A. Fratti. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Mol Microbiol* 31:1603-1609.
45. Hmama, Z., R. Gabathuler, W. A. Jefferies, G. de Jong, and N. E. Reiner. 1998. Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers. *J Immunol* 161:4882-4893.
46. Pai, R. K., M. Convery, T. A. Hamilton, W. H. Boom, and C. V. Harding. 2003. 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* 171:175-184.
47. Manfredi, A. A., S. Heltai, P. Rovere, C. Sciorati, C. Paolucci, G. Galati, C. Rugarli, R. Vaiani, E. Clementi, and M. Ferrarini. 1998. *Mycobacterium tuberculosis* exploits the CD95/CD95 ligand system of gammadelta T cells to cause apoptosis. *Eur J Immunol* 28:1798-1806.
48. Li, B., H. Bassiri, M. D. Rossman, P. Kramer, A. F. Eyuboglu, M. Torres, E. Sada, T. Imir, and S. R. Carding. 1998. Involvement of the Fas/Fas ligand pathway in activation-induced cell death of mycobacteria-reactive human gamma delta T cells: a mechanism for the loss of gamma delta T cells in patients with pulmonary tuberculosis. *J Immunol* 161:1558-1567.
49. Singhal, A., A. Jaiswal, V. K. Arora, and H. K. Prasad. 2007. Modulation of Interferon Gamma Receptor 1 By *Mycobacterium tuberculosis*: A potential immune evasive mechanism. *Infect Immun*.
50. Trinchieri, G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 13:251-276.
51. Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J. C. Howard. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15:749-795.
52. Bonecini-Almeida, M. G., S. Chitale, I. Boutsikakis, J. Geng, H. Doo, S. He, and J. L. Ho. 1998. Induction of in vitro human macrophage anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity: requirement for IFN-gamma and primed lymphocytes. *J Immunol* 160:4490-4499.
53. Vankayalapati, R., B. Wizel, S. E. Weis, B. Samten, W. M. Girard, and P. F. Barnes. 2000. Production of interleukin-18 in human tuberculosis. *J Infect Dis* 182:234-239.
54. Vankayalapati, R., B. Wizel, D. L. Lakey, Y. Zhang, K. A. Coffee, D. E. Griffith, and P. F. Barnes. 2001. T cells enhance production of IL-18 by monocytes in response to an intracellular pathogen. *J Immunol* 166:6749-6753.
55. Garcia, V. E., K. Uyemura, P. A. Sieling, M. T. Ochoa, C. T. Morita, H. Okamura, M. Kurimoto, T. H. Rea, and R. L. Modlin. 1999. IL-18 promotes type

- 1 cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection. *J Immunol* 162:6114-6121.
56. Bonecini-Almeida, M. G., J. L. Ho, N. Boechat, R. C. Huard, S. Chitale, H. Doo, J. Geng, L. Rego, L. C. Lazzarini, A. L. Kritski, W. D. Johnson, Jr., T. A. McCaffrey, and J. R. Silva. 2004. Down-modulation of lung immune responses by interleukin-10 and transforming growth factor beta (TGF-beta) and analysis of TGF-beta receptors I and II in active tuberculosis. *Infect Immun* 72:2628-2634.
 57. Saunders, B. M., S. Tran, S. Ruuls, J. D. Sedgwick, H. Briscoe, and W. J. Britton. 2005. Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* 174:4852-4859.
 58. Mohan, V. P., C. A. Scanga, K. Yu, H. M. Scott, K. E. Tanaka, E. Tsang, M. M. Tsai, J. L. Flynn, and J. Chan. 2001. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun* 69:1847-1855.
 59. Keane, J., M. K. Balcewicz-Sablinska, H. G. Remold, G. L. Chupp, B. B. Meek, M. J. Fenton, and H. Kornfeld. 1997. Infection by Mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun* 65:298-304.
 60. Flynn, J. L., J. Chan, K. J. Triebold, D. K. Dalton, T. A. Stewart, and B. R. Bloom. 1993. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med* 178:2249-2254.
 61. Nicholson, S., G. Bonecini-Almeida Mda, J. R. Lapa e Silva, C. Nathan, Q. W. Xie, R. Mumford, J. R. Weidner, J. Calaycay, J. Geng, N. Boechat, C. Linhares, W. Rom, and J. L. Ho. 1996. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med* 183:2293-2302.
 62. Sodhi, A., J. Gong, C. Silva, D. Qian, and P. F. Barnes. 1997. Clinical correlates of interferon gamma production in patients with tuberculosis. *Clin Infect Dis* 25:617-620.
 63. Othieno, C., C. S. Hirsch, B. D. Hamilton, K. Wilkinson, J. J. Ellner, and Z. Toossi. 1999. Interaction of Mycobacterium tuberculosis-induced transforming growth factor beta1 and interleukin-10. *Infect Immun* 67:5730-5735.
 64. Ellner, J. J. 1997. Regulation of the human immune response during tuberculosis. *J Lab Clin Med* 130:469-475.
 65. Toossi, Z., M. E. Kleinhenz, and J. J. Ellner. 1986. Defective interleukin 2 production and responsiveness in human pulmonary tuberculosis. *J Exp Med* 163:1162-1172.
 66. Fujiwara, H., M. E. Kleinhenz, R. S. Wallis, and J. J. Ellner. 1986. Increased interleukin-1 production and monocyte suppressor cell activity associated with human tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 133:73-77.
 67. Zhang, M., Y. Lin, D. V. Iyer, J. Gong, J. S. Abrams, and P. F. Barnes. 1995. T-cell cytokine responses in human infection with Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 63:3231-3234.
 68. Toossi, Z., P. Gogate, H. Shiratsuchi, T. Young, and J. J. Ellner. 1995. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions. *J Immunol* 154:465-473.

69. Hirsch, C. S., J. J. Ellner, R. Blinkhorn, and Z. Toossi. 1997. In vitro restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against *Mycobacterium tuberculosis* by natural inhibitors of transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3926-3931.
70. Schwander, S. K., E. Sada, M. Torres, D. Escobedo, J. G. Sierra, S. Alt, and E. A. Rich. 1996. T lymphocytic and immature macrophage alveolitis in active pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 173:1267-1272.
71. Schwander, S. K., M. Torres, E. Sada, C. Carranza, E. Ramos, M. Tary-Lehmann, R. S. Wallis, J. Sierra, and E. A. Rich. 1998. Enhanced responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens by human alveolar lymphocytes during active pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 178:1434-1445.
72. Condos, R., W. N. Rom, Y. M. Liu, and N. W. Schluger. 1998. Local immune responses correlate with presentation and outcome in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 157:729-735.
73. Mazzarella, G., A. Bianco, F. Perna, D. D'Auria, E. Grella, E. Moscariello, and A. Sanduzzi. 2003. T lymphocyte phenotypic profile in lung segments affected by cavitary and non-cavitary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 132:283-288.
74. Ribeiro-Rodrigues, R., T. Resende Co, J. L. Johnson, F. Ribeiro, M. Palaci, R. T. Sa, E. L. Maciel, F. E. Pereira Lima, V. Dettoni, Z. Toossi, W. H. Boom, R. Dietze, J. J. Ellner, and C. S. Hirsch. 2002. Sputum cytokine levels in patients with pulmonary tuberculosis as early markers of mycobacterial clearance. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:818-823.
75. Aubert-Pivert, E. M., F. M. Chedevergne, G. M. Lopez-Ramirez, J. H. Colle, P. L. Scheinmann, B. M. Gicquel, and J. M. de Blic. 2000. Cytokine transcripts in pediatric tuberculosis: a study with bronchoalveolar cells. *Tuber Lung Dis* 80:249-258.
76. Zissel, G., I. Baumer, M. Schlaak, and J. Muller-Quernheim. 2000. In vitro release of interleukin-15 by broncho-alveolar lavage cells and peripheral blood mononuclear cells from patients with different lung diseases. *Eur Cytokine Netw* 11:105-112.
77. Yin, X. J., R. Schafer, J. Y. Ma, J. M. Antonini, D. D. Weissman, P. D. Siegel, M. W. Barger, J. R. Roberts, and J. K. Ma. 2002. Alteration of pulmonary immunity to *Listeria monocytogenes* by diesel exhaust particles (DEPs). I. Effects of DEPs on early pulmonary responses. *Environ Health Perspect* 110:1105-1111.
78. Taha, R. A., T. C. Kotsimbos, Y. L. Song, D. Menzies, and Q. Hamid. 1997. IFN-gamma and IL-12 are increased in active compared with inactive tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 155:1135-1139.
79. Rich, E. A., J. R. Panuska, R. S. Wallis, C. B. Wolf, M. L. Leonard, and J. J. Ellner. 1989. Dyscoordinate expression of tumor necrosis factor-alpha by human blood monocytes and alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* 139:1010-1016.
80. Law, K., M. Weiden, T. Harkin, K. Tchou-Wong, C. Chi, and W. N. Rom. 1996. Increased release of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 153:799-804.
81. Giacomini, E., E. Iona, L. Ferroni, M. Miettinen, L. Fattorini, G. Orefici, I. Julkunen, and E. M. Coccia. 2001. Infection of human macrophages and dendritic

- cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J Immunol* 166:7033-7041.
82. Watford, W. T., B. D. Hissong, J. H. Bream, Y. Kanno, L. Muul, and J. J. O'Shea. 2004. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol Rev* 202:139-156.
 83. Trinchieri, G. 1998. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. *Int Rev Immunol* 16:365-396.
 84. Gately, M. K., L. M. Renzetti, J. Magram, A. S. Stern, L. Adorini, U. Gubler, and D. H. Presky. 1998. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 16:495-521.
 85. Desai, B. B., P. M. Quinn, A. G. Wolitzky, P. K. Mongini, R. Chizzonite, and M. K. Gately. 1992. IL-12 receptor. II. Distribution and regulation of receptor expression. *J Immunol* 148:3125-3132.
 86. Presky, D. H., L. J. Minetti, S. Gillesen, V. L. Wilkinson, C. Y. Wu, U. Gubler, R. Chizzonite, and M. K. Gately. 1998. Analysis of the multiple interactions between IL-12 and the high affinity IL-12 receptor complex. *J Immunol* 160:2174-2179.
 87. Presky, D. H., H. Yang, L. J. Minetti, A. O. Chua, N. Nabavi, C. Y. Wu, M. K. Gately, and U. Gubler. 1996. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14002-14007.
 88. Szabo, S. J., A. S. Dighe, U. Gubler, and K. M. Murphy. 1997. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 185:817-824.
 89. Rogge, L., A. Papi, D. H. Presky, M. Biffi, L. J. Minetti, D. Miotto, C. Agostini, G. Semenzato, L. M. Fabbri, and F. Sinigaglia. 1999. Antibodies to the IL-12 receptor beta 2 chain mark human Th1 but not Th2 cells in vitro and in vivo. *J Immunol* 162:3926-3932.
 90. Rogge, L., L. Barberis-Maino, M. Biffi, N. Passini, D. H. Presky, U. Gubler, and F. Sinigaglia. 1997. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* 185:825-831.
 91. Caragol, I., M. Raspall, C. Fieschi, J. Feinberg, M. N. Larrosa, M. Hernandez, C. Figueras, J. M. Bertran, J. L. Casanova, and T. Espanol. 2003. Clinical tuberculosis in 2 of 3 siblings with interleukin-12 receptor beta1 deficiency. *Clin Infect Dis* 37:302-306.
 92. Altare, F., A. Ensser, A. Breiman, J. Reichenbach, J. E. Baghdadi, A. Fischer, J. F. Emile, J. L. Gaillard, E. Meinel, and J. L. Casanova. 2001. Interleukin-12 receptor beta1 deficiency in a patient with abdominal tuberculosis. *J Infect Dis* 184:231-236.
 93. Cooper, A. M., D. K. Dalton, T. A. Stewart, J. P. Griffin, D. G. Russell, and I. M. Orme. 1993. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 178:2243-2247.
 94. Lee, S., M. A. French, and P. Price. 2004. IL-23 and IFN-gamma deficiency in immunodeficient HIV patients who achieved a long-term increase in CD4 T-cell counts on highly active antiretroviral therapy. *Aids* 18:1337-1340.

95. Altare, F., A. Durandy, D. Lammas, J. F. Emile, S. Lamhamedi, F. Le Deist, P. Drysdale, E. Jouanguy, R. Doffinger, F. Bernaudin, O. Jeppsson, J. A. Gollob, E. Meinel, A. W. Segal, A. Fischer, D. Kumararatne, and J. L. Casanova. 1998. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* 280:1432-1435.
96. Fieschi, C., and J. L. Casanova. 2003. The role of interleukin-12 in human infectious diseases: only a faint signature. *Eur J Immunol* 33:1461-1464.
97. van de Vosse, E., M. A. Hoeve, and T. H. Ottenhoff. 2004. Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect Dis* 4:739-749.
98. Jouanguy, E., F. Altare, S. Lamhamedi-Cherradi, and J. L. Casanova. 1997. Infections in IFNGR-1-deficient children. *J Interferon Cytokine Res* 17:583-587.
99. Jouanguy, E., S. Lamhamedi-Cherradi, F. Altare, M. C. Fondaneche, D. Tuerlinckx, S. Blanche, J. F. Emile, J. L. Gaillard, R. Schreiber, M. Levin, A. Fischer, C. Hivroz, and J. L. Casanova. 1997. Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with tubercloid bacillus Calmette-Guerin infection and a sibling with clinical tuberculosis. *J Clin Invest* 100:2658-2664.
100. Picard, C., C. Fieschi, F. Altare, S. Al-Jumaah, S. Al-Hajjar, J. Feinberg, S. Dupuis, C. Soudais, I. Z. Al-Mohsen, E. Genin, D. Lammas, D. S. Kumararatne, T. Leclerc, A. Ruffi, H. Frayha, B. Murugasu, L. B. Wah, R. Sinniah, M. Loubser, E. Okamoto, A. Al-Ghoniaim, H. Tufenkeji, L. Abel, and J. L. Casanova. 2002. Inherited interleukin-12 deficiency: IL12B genotype and clinical phenotype of 13 patients from six kindreds. *Am J Hum Genet* 70:336-348.
101. 1969. Classification of pulmonary tuberculosis. In Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis. 68-74.
102. Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
103. Barry, S. M., M. C. Lipman, B. Bannister, M. A. Johnson, and G. Janossy. 2003. Purified protein derivative-activated type 1 cytokine-producing CD4+ T lymphocytes in the lung: a characteristic feature of active pulmonary and nonpulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 187:243-250.
104. Morosini, M., F. Meloni, A. Marone Bianco, E. Paschetto, M. Uccelli, E. Pozzi, and A. Fietta. 2003. The assessment of IFN-gamma and its regulatory cytokines in the plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 7:994-1000.
105. Zhang, M., M. K. Gately, E. Wang, J. Gong, S. F. Wolf, S. Lu, R. L. Modlin, and P. F. Barnes. 1994. Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *J Clin Invest* 93:1733-1739.
106. Taha, R. A., E. M. Minshall, R. Olivenstein, D. Ihaku, B. Wallaert, A. Tscopoulos, A. B. Tonnel, R. Damia, D. Menzies, and Q. A. Hamid. 1999. Increased expression of IL-12 receptor mRNA in active pulmonary tuberculosis and sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1119-1123.
107. Carranza, C., E. Juarez, M. Torres, J. J. Ellner, E. Sada, and S. K. Schwander. 2006. Mycobacterium tuberculosis growth control by lung macrophages and CD8 cells from patient contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 173:238-245.

108. Condos, R., W. N. Rom, and N. W. Schluger. 1997. Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon-gamma via aerosol. *Lancet* 349:1513-1515.
109. Dheda, K., J. S. Chang, R. A. Breen, J. A. Haddock, M. C. Lipman, L. U. Kim, J. F. Huggett, M. A. Johnson, G. A. Rook, and A. Zumla. 2005. Expression of a novel cytokine, IL-4delta2, in HIV and HIV-tuberculosis co-infection. *Aids* 19:1601-1606.
110. Dheda, K., J. S. Chang, R. A. Breen, L. U. Kim, J. A. Haddock, J. F. Huggett, M. A. Johnson, G. A. Rook, and A. Zumla. 2005. In vivo and in vitro studies of a novel cytokine, interleukin 4delta2, in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 172:501-508.
111. Dheda, K., J. S. Chang, J. F. Huggett, L. U. Kim, M. A. Johnson, A. Zumla, and G. A. Rook. 2007. The stability of mRNA encoding IL-4 is increased in pulmonary tuberculosis, while stability of mRNA encoding the antagonistic splice variant, IL-4delta2, is not. *Tuberculosis (Edinb)* 87:237-241.
112. Fletcher, H. A., P. Owiafe, D. Jeffries, P. Hill, G. A. Rook, A. Zumla, T. M. Doherty, and R. H. Brookes. 2004. Increased expression of mRNA encoding interleukin (IL)-4 and its splice variant IL-4delta2 in cells from contacts of *Mycobacterium tuberculosis*, in the absence of in vitro stimulation. *Immunology* 112:669-673.
113. Seah, G. T., and G. A. Rook. 2001. IL-4 influences apoptosis of mycobacterium-reactive lymphocytes in the presence of TNF-alpha. *J Immunol* 167:1230-1237.
114. Seah, G. T., G. M. Scott, and G. A. Rook. 2000. Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. *J Infect Dis* 181:385-389.
115. Ribeiro-Rodrigues, R., T. Resende Co, R. Rojas, Z. Toossi, R. Dietze, W. H. Boom, E. Maciel, and C. S. Hirsch. 2006. A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 144:25-34.
116. Roura-Mir, C., L. Wang, T. Y. Cheng, I. Matsunaga, C. C. Dascher, S. L. Peng, M. J. Fenton, C. Kirschning, and D. B. Moody. 2005. Mycobacterium tuberculosis regulates CD1 antigen presentation pathways through TLR-2. *J Immunol* 175:1758-1766.
117. Stenger, S., K. R. Niazi, and R. L. Modlin. 1998. Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 161:3582-3588.
118. Kincaid, E. Z., and J. D. Ernst. 2003. Mycobacterium tuberculosis exerts gene-selective inhibition of transcriptional responses to IFN-gamma without inhibiting STAT1 function. *J Immunol* 171:2042-2049.
119. Pai, R. K., M. E. Pennini, A. A. Tobian, D. H. Canaday, W. H. Boom, and C. V. Harding. 2004. Prolonged toll-like receptor signaling by Mycobacterium tuberculosis and its 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-induced regulation of selected genes in macrophages. *Infect Immun* 72:6603-6614.
120. Pennini, M. E., R. K. Pai, D. C. Schultz, W. H. Boom, and C. V. Harding. 2006. Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein inhibits IFN-gamma-induced

- chromatin remodeling of MHC2TA by TLR2 and MAPK signaling. *J Immunol* 176:4323-4330.
121. Noss, E. H., R. K. Pai, T. J. Sellati, J. D. Radolf, J. Belisle, D. T. Golenbock, W. H. Boom, and C. V. Harding. 2001. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 167:910-918.



Compartmentalized bronchoalveolar IFN- γ and IL-12 response in human pulmonary tuberculosis

Maria Teresa Herrera^a, Martha Torres^a, Denarra Nevels^b, Carlos Núñez Perez-Redondo^a, Jerrold J. Ellner^b, Eduardo Sada^a, Stephan K. Schwander^{b,*}

^a Departamento de Microbiología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Mexico City, Mexico

^b Department of Medicine and Ruy V. Lourenco Center for the Study of Emerging and Reemerging Pathogens, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, New Jersey Medical School, 185 South Orange Avenue, MSB 1-503, Newark, NJ 07103, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 January 2008

Received in revised form 12 June 2008

Accepted 18 August 2008

Keywords:

Human pulmonary tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis

BAL cells

Interferon gamma

Interleukin 12

Interleukin 10

Interleukin 4

Compartmentalization

SUMMARY

Human tuberculosis (TB) principally involves the lungs, where local immunity impacts on the load of *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*). Because concomitants of local Th1 immunity are still under-explored in humans, we characterized immune responses in bronchoalveolar cells (BACs) and systemically in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in persons with active pulmonary TB and in healthy community controls. PPD- and live *M.tb*-induced IFN- γ -production were observed in CD4⁺, CD8⁺, $\gamma\delta$ TCR⁺, and CD56⁺ alveolar T cell subpopulations and NK cells (CD3⁺CD56⁺). IFN- γ -producing CD4⁺ T cells (mostly CD45RO⁺) were more abundant ($p < 0.05$). *M.tb*-induced IL-12p70, but interestingly also IL-4, was increased ($p < 0.05$) in BACs from TB patients. Constitutive expression of IL-12R β 1 and IL-12R β 2 mRNA in BACs and PBMCs and IFN- γ R1 in BACs was similar in both study groups. Data were normalized to account for differences in proportions of alveolar T cells and macrophages in the study groups. IFN- γ -production and its induction by IL-12R engagement occur virtually unimpaired in the bronchoalveolar spaces of patients with pulmonary TB. The reasons for the apparent failure to control *M. tuberculosis* growth during active pulmonary TB disease is unknown but could be the expression of locally acting immunosuppressive mechanisms that subvert the antimycobacterial effects of IFN- γ .

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Mycobacterium tuberculosis (*M.tb*), the etiological agent of TB causes latent infection in a third of the world's population. In the majority of cases, protective immune responses contain the primary *M.tb* infection in an asymptomatic latent state. Only 5–10% of infected individuals actually develop active TB disease during their lifetime.¹ Despite its ability to affect many organs, TB most commonly presents as a pulmonary disease.

Although readily measured, systemic immunity does not accurately reflect pulmonary immune responses in the bronchoalveolar spaces at the entry site of aerosolized *M.tb* in humans. Systemic immune responses during human TB are characterized by reduced production of IFN- γ upon *in vitro* stimulation of PBMCs with *M.tb*² or *M.tb* antigens,^{3,4} and suppression of antigen-specific lymphocyte

proliferation,^{5–7} or IL-2-, and IFN- γ -production^{8–10} by products of monocytes and macrophages.^{3,5,9,11–14}

Our group has previously shown the presence of an alveolitis of compartmentalized activated $\alpha\beta$ TCR-bearing lymphocytes (CD69⁺, HLA-DR⁺, transferrin receptor⁺), and of immature alveolar macrophages¹⁵ during adult pulmonary TB disease. We have also shown increased lymphocyte proliferation and IFN- γ release upon PPD stimulation of whole bronchoalveolar cells (BACs)^{15,16} and together with others^{17,18} increased constitutive IFN- γ levels in BACs. Similarly constitutive IFN- γ levels are increased in sputum¹⁹ during adult TB and in BACs from pediatric TB patients.²⁰

Alveolar macrophages are among the first cells to come into contact with *M.tb* from inhaled droplet nuclei and are involved in innate and the initiation of adaptive immune mechanisms. Alveolar macrophages²¹ and dendritic cells^{22–24} produce IL-12 and additional cyto- and chemokines such as TNF- α ,^{25,26} IL-1, IL-6,²⁶ IL-15, and IL-18.^{27,28}

IL-12 serves as a master regulator of the Th1 response by inducing the production of IFN- γ .^{29–31} IL-12 binds to its high affinity receptor (IL-12R),^{32,33} a heterodimer that consists of a β 1 (IL-12R β 1) and a β 2 (IL-12R β 2) subunit.³⁴ IL-12R β 1 is involved in

* Corresponding author. Aeras – Global TB Vaccine Foundation, Rockville, MD, USA. Tel.: +1 240 599 3045; fax: +1 301 547 2987.

E-mail addresses: schwansk@umdnj.edu, sschwander@aeras.org, schwansk2002@yahoo.com (S.K. Schwander).

IL-12 binding and expressed on both Th1 and Th2 cells.²⁹ In contrast IL-12Rβ2 is expressed on Th1 cells only,^{35–37} is involved in IL-12 binding and induces STAT-4 mediated intracellular signaling for IFN-γ-production.^{29,32–34}

IFN-γ plays a central role in *M.tb* immunity by regulating the expression of a host of genes involved in antimycobacterial effector functions. By binding to its receptor (IFN-γR), IFN-γ activates macrophages to produce bactericidal superoxide, and reactive nitrogen intermediates, as well as TNF-α, IL-12, IL-1 and IL-6.³⁸ Consequently IFN-γ knockout mice fail to produce reactive nitrogen intermediates and succumb rapidly to experimental infection with *M.tb*.^{39,40} Similarly, humans with hereditary failures of the IFN-γ/IL-12/IL-23 axis are at increased risk for mycobacterial infection^{41–44} mostly with avirulent^{45,46} but also virulent mycobacteria.^{42,47,48}

As demonstrated by the shedding of viable *M.tb* into the airways and progressive lung pathology during active untreated pulmonary TB disease, there is deficient *M.tb* growth control in the bronchoalveolar compartment despite enhanced local Th1 immunity. We thus hypothesized that BACs of TB patients would be characterized by abnormalities in the protein or mRNA expression of IFN-γ, IL-12p70, IL-12Rβ1, IL-12Rβ2 or IFN-γR1 or by release of immunosuppressive cytokines.

The current study was therefore designed to explore (1) the phenotype of IFN-γ-releasing resident lung T cell populations, (2) the *M.tb*-specific and IL-12R-mediated IFN-γ-production, (3) the production of IL-12p70, (4) the expression of IL-12Rβ1, IL-12Rβ2 and IFN-γR1, and (5) the production of immunosuppressive cytokines (IL-4, IL-9, IL-10 and TGF-β) in the bronchoalveolar spaces and the systemic compartment during active pulmonary TB and in comparison with healthy community controls (CCs).

PPD-, and live *M.tb*-induced IFN-γ-production were found in BACs from TB patients and all major alveolar T cell subpopulations and NK cells. IFN-γ and IL-12p70 responses to mycobacterial antigens were significantly increased in BACs from TB patients in comparison to autologous PBMCs and to BACs and PBMCs from CCs. There was no evidence of reduced or altered expression of the IL-12R subunits or of IFN-γR1 nor was there functional impairment of the receptors. However, we found elevated IL-4 levels in supernatants of *M.tb* stimulated BACs from patients with TB. This and data from other studies suggest the presence of distinct local immunosuppressive mechanisms that interfere with Th1-mediated effector functions in patients with active pulmonary TB who are unable to control *M.tb* growth in the bronchoalveolar environment.

2. Material and methods

Approval to obtain BACs by bronchoalveolar lavage (BAL), to perform venipunctures and to obtain personal health information from the study subjects was obtained from the Institutional Review Boards of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias in Mexico City, and the University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Newark.

2.1. Study subjects

Informed written consent was obtained from all study subjects prior to performing any procedures. Study subjects willing to undergo BAL, venipuncture, chest radiographs, HIV-1 serology and tuberculin skin test (TST) were recruited at the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Eight subjects (four male, four female) with acid fast bacilli sputum smears that were positive and confirmed by sputum culture representing drug-sensitive, active pulmonary TB were included in this study. Two of the patients had moderately-advanced TB, and six had far-advanced TB according to ATS radiographic criteria.⁴⁹ All patients were TST positive (10–35 mm

induration at 72 h). Median duration of antituberculous chemotherapy prior to the research BAL procedures was five days.

Fourteen healthy persons (nine male, five female) were recruited as CCs. CCs had no clinical or radiographic evidence of respiratory diseases and no known concurrent or past contact with TB patients. Six CCs were TST negative (0 mm), three had TST induration of ≤10 mm and five of >10 mm. TST positive and TST negative CCs are presented as a single subject group. Differences identified in this study between CCs and TB patients were independent of the TST status of the CCs. Patients with TB and CCs had a median age of 29 years (range 19–60 years). Seven of the eight TB patients and 13 of 14 CCs had a scar indicating childhood BCG vaccination.

2.2. Preparation of BACs

BACs were obtained by BAL. Briefly, after local anesthesia of the upper airways with 2% lidocaine solution, and additional instillation of 1% lidocaine in the lower airways, a flexible fiberoptic bronchoscope (P30, Olympus BF, New Hyde Park, NY) was wedged consecutively into two segments of the radiographically involved lungs in the TB patients and into two segments of the right middle lobe in CC. A total of 300 mL sterile saline solution (150 mL/segment) was instilled in 20 mL aliquots. Median recovery of bronchoalveolar lavage fluid (BAL fluid) was 72% and 68% in TB patients and CC, respectively. Following centrifugation, BACs were re-suspended, counted and adjusted at 10⁶/mL in complete culture medium [RPMI 1640 medium (BioWhittaker, Walkersville, MD), supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), 50 µg/mL gentamycin sulfate (BioWhittaker) and 10% heat-inactivated pooled AB human serum (Gemini, Woodland, CA)]. Viability of cells was 95% (median, range 93–99%) by trypan blue exclusion (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY). Yield of BACs from TB patients (median, 55 × 10⁶) was greater than that from CC (median, 31 × 10⁶). The cell-free BAL fluid was stored at –20 °C for measurement of IL-10 and TGF-β by ELISA.

2.3. Preparation of PBMCs

PBMCs were prepared by centrifugation (300 g, 45 min, 21 °C) of heparinized venous whole blood (WB) diluted 1:1 with RPMI alone over a Ficoll-Paque (Axis-Shield PoC As, Oslo, Norway)⁵⁰ density gradient. PBMCs were removed from the interface, washed and re-suspended in complete culture medium and then counted and adjusted at 10⁶/mL. Viability of PBMCs was 100% by trypan blue exclusion.

2.4. Preparation of *M.tb* H37Ra for in vitro stimulation

Suspensions of *M.tb* strain H37Ra (ATCC #25177, Manassas, VA) were prepared in Middlebrook 7H9 broth medium (Difco Laboratories, Detroit, MI) supplemented with 10% albumin dextrose catalase (Difco Laboratories) and 0.2% glycerol. Following a 21-day incubation period at 37 °C on an orbital shaking incubator, *M.tb* stock suspensions were harvested, aliquoted and stored at –70 °C until use. Concentrations of the *M.tb* stock suspensions were determined by CFU counts from serial dilutions after 21 days of incubation on 7H10 solid medium. For the preparation of unclumped single-cell *M.tb* suspensions, *M.tb* stock cultures were re-suspended in infection medium (RPMI with L-glutamine and 30% pooled AB human serum) and clumps broken up by vortexing for 5 min in the presence of sterile 3mm glass beads. Remaining *M.tb* clumps were removed with an additional centrifugation step (82 g, 10 min). Appropriate volumes of single-cell *M.tb* stock suspensions (and thus constant CFU numbers) were used for each *in vitro* stimulation to obtain the desired MOI (*M.tb*/cell) of 10 per BAC or monocyte.

2.5. Cell subset analysis in BACs and PBMCs

For fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis, 2×10^5 BACs or PBMCs in complete culture medium were stained with PerCp-labeled anti-human CD3, and FITC-labeled anti-human CD4, CD8, CD56, or $\gamma\delta$ TCR monoclonal antibodies (BD Biosciences, San José, CA) during a 15-min incubation at room temperature in the dark. Cells were then washed with PBS and fixed with 1% para-formaldehyde (Sigma Chemical Co.). Isotype antibodies labeled with γ_1 PerCp, γ_1 FITC and γ_2 FITC were included to assess nonspecific binding and define quadrant positions for analysis. Cells were acquired on a FACS Calibur[®] flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) and analyzed in lymphocyte gates (CD3⁺ vs. SSC or FSC vs. SSC) using Cell Quest[®] research software version 3.3 (1996–1999). Alveolar T cell subset distributions are reported as percentages of positive cells within CD3⁺ alveolar cells and NK cells reported as CD56⁺ cells within a lymphocyte gate (FSC vs. SSC).

2.6. Intracellular IFN- γ production

IFN- γ production was assessed by intracellular staining and FACS analysis of BACs or WB following *in vitro* stimulation of the cells with PPD and live *M.tb*. BACs (2×10^6) in 2 mL complete culture media, or 1 mL WB were either left unstimulated (culture medium), or stimulated with 10 μ g PPD (Staten Serum Institute, Copenhagen, Denmark) or live *M.tb* at MOI 10 and incubated at 37 °C in 5% CO₂ for a period of 12 h. Brefeldin A (Sigma Chemical Co.) was added during the last 4 h of the incubation. BACs (2×10^5) or 100 μ L WB were surface-stained with PerCp-labeled anti-human CD3, CD4, and CD8, and FITC-labeled CD4, CD8, CD56, $\gamma\delta$ TCR and CD45RO monoclonal antibodies. After 15 min of incubation, red blood cells were lysed in WB samples (1 \times lysis solution, BD Biosciences). BACs and remaining white blood cells were then permeabilized (1 \times permeabilizing solution, BD Biosciences) and incubated for 30 min with anti-human IFN- γ PE and CD69FITC and their respective γ_1 PerCp, γ_1 FITC, γ_2 FITC and γ_2 PE-labeled isotype antibodies (BD Biosciences). Cells were subsequently washed, fixed and the proportions of IFN- γ -producing CD4⁺, CD8⁺, $\gamma\delta$ TCR⁺, CD56⁺ and CD45RO⁺ cells determined within a CD3 gate. Proportions of IFN- γ -producing NK cells were determined in a lymphocyte gate (FSC vs. SSC).

2.7. IFN- γ production by ELISA in culture supernatants from BACs and PBMCs

IFN- γ production was measured in culture supernatants from *in vitro* stimulated BACs and PBMCs. BACs or PBMCs were plated at a concentration of 10^6 /mL in complete culture medium in 24-well culture plates. BACs and PBMCs were then either left unstimulated (culture medium), or stimulated with PPD (10 μ g/mL), live *M.tb* at MOI 10, rhIL-12 (5 ng/mL, R&D System Co., Palo Alto, CA), PHA (5 μ g/mL) plus rhIL-12 (5 ng/mL) (PHA stimulates expression of IL-12R), or PHA (5 μ g/mL). Culture supernatants were collected after a 24-h incubation period, and stored frozen at -70 °C until cytokine determination. IFN- γ concentrations were assessed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using anti-human IFN- γ Abs (Endogen, Woburn, MA). Absorbance was read on a microplate reader (Labsystems Multiskan MCC/340, Labsystems, Finland) at 450 nm. Following removal of supernatants, cultured cells were lysed in Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) and lysates stored frozen at -70 °C for qRT-PCR.

2.8. IL-4, IL-9, IL-10 and IL-12p70 determination in culture supernatants from PBMCs and BACs by Multiplex Bead Array Assay

Cytokines were measured in 24-h culture supernatants from 10^6 /mL BACs and PBMCs of TB patients and CCs, respectively, in

unstimulated cells (culture medium) and following stimulation with live *M.tb* MOI 10 and/or LPS (5 μ g/mL, Sigma Chemical Co.). Cytokine production was determined in duplicate wells using Beadlyte Multiplex Immunoassay Kits (Upstate, Temecula, CA). Plates were read using a Luminex 100™ reader. The lower limits of detection using this method were 1.84, <1.0, 0.34 and 0.76 pg/mL for IL-4, IL-9, IL-10 and IL-12p70, respectively.

2.9. Cytokine determination in BAL fluid

Concentrations of IL-10 and TGF- β were determined by ELISA in unconcentrated BAL fluid samples that were recovered from the first 60 mL of saline fluid that was instilled during the BAL procedure. ELISA assays were performed according to the manufacturer's recommendations (R&D Systems, Minneapolis, MN).

2.10. Total RNA extraction and cDNA synthesis

To determine the expression of the IFN- γ , IL-12R β 1, IL-12R β 2, TNF- α and IFN- γ R1 genes in BACs and PBMCs from patients with TB and CCs, cells were stimulated for 24 h with PPD (10 μ g/mL), live *M.tb* at MOI 10, rhIL-12 (5 μ g/mL, Sigma Chemical Co.), rhIL-12 plus PHA (5 μ g/mL), PHA alone (5 μ g/mL), rhIFN- γ alone (100 U), LPS alone (5 μ g/mL, Sigma Chemical Co.) or left unstimulated (culture medium). Stimulated and unstimulated BACs and PBMCs were then lysed in Trizol (Invitrogen) and lysates kept frozen (-70 °C) until extraction of RNA. RNA was extracted from lysates according to standard methods.⁵¹ Briefly, cell lysates were mixed with chloroform and centrifuged. Following removal of the aqueous phase, RNA was precipitated with cold isopropanol, washed with 75% cold ethanol, dried and re-suspended in DEPC-water (BioWhittaker, Walkersville, MD). RNA concentrations were determined at 260 nm in a NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE) and purity was defined by measurement at 260 and 280 nm with a ratio >1.8 considered acceptable. For the cDNA synthesis RNA was mixed with 10 mM dNTPs and random hexamers, incubated at 65 °C for 5 min and mixed with Reverse Transcriptase Mix (10 \times Reverse Transcriptase buffer, 25 mM MgCl₂ and RNaseOUT recombinant, Ribonuclease inhibitor). The cDNA was synthesized using SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions with SuperScript II RT enzyme at 25 °C for 10 min, 42 °C for 50 min and 70 °C for 10 min. cDNAs were then treated with RNase H, and their concentrations determined at 260 nm prior to preparing 20 ng/ μ L dilutions for qRT-PCR.

2.11. Gene expression analysis by qRT-PCR

Pre-Developed TaqMan Assay Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA) were used to determine the expression of IFN- γ and TNF- α genes according to the manufacturer's instructions. The endogenous control (housekeeping) gene 18S rRNA was identified as the most stable gene in preliminary experiments comparing stimulated and unstimulated BACs and PBMCs using a commercially available TaqMan Human Endogenous Control Plate (Applied Biosystems). IL-12R β 1, IL-12R β 2, and IFN- γ R1 primers and probes were designed using Primer Express software (Applied Biosystems) and the probes were labeled (Applied Biosystems). qRT-PCR was performed following standard procedures. Briefly, universal master mix, target gene primers and probes (IFN- γ , IL-12R β 1, IL-12R β 2, IFN- γ R1, TNF- α and 18S rRNA) and DEPC water were mixed and added to each well within 96-well plates together with sample cDNA (60 ng/well). Seven serial dilutions (range from 1 to 10⁻⁷ pg) of each target gene plasmid were included to obtain a standard curve permitting assessment of target gene mRNA copy numbers. An 18S rRNA

standard curve was added to each plate and run simultaneously with each cell type, for each experimental condition, and each donor sample. Amplification reactions were performed using an ABI Prisma 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) starting with 2 min incubations at 50 °C, followed by 10 min at 95 °C and 40 cycles of 30 s at 95 °C, and 60 s at 60 °C. To control for intra-, and inter-experimental variations in mRNA expression, median values of 18S rRNA copy numbers were generated as baseline values for each cell type, stimulus and study group (TB patients and CC), respectively. These median 18S rRNA copy values were then used to normalize the target gene mRNA copy numbers for the respective cell types, stimuli and study groups.

2.12. Normalization procedure of gene expression data

BACs from TB patients contained 3-fold more alveolar CD3⁺ T cells (see % CD3⁺BACs, Table 1 and Results page 18) and a relatively smaller proportion of alveolar macrophages than BACs from CCs. IL-12Rβ1 and IL-12Rβ2 copy numbers were therefore normalized by dividing the proportion of alveolar CD3⁺ T cells from each individual TB patient with the median proportion of alveolar CD3⁺ T cells from the CC group obtained by FACS. Similarly, IFN-γ receptor 1 copy numbers were normalized by dividing the proportion of CD3⁺ alveolar cells from each TB patient with the median proportion of CD3⁺ alveolar cells from the CC group obtained by FACS.

2.13. Statistical analysis

Comparisons between subject groups were made using the nonparametric Mann–Whitney Rank Sum Test. Comparisons between different stimulation conditions within subject groups were made with the Wilcoxon Signed Rank Test. The analyses were made with the SPSS Statistical Software package, version 13.0 (2004). Statistical significance was considered at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Cytospin analysis

By cytospin analysis (Wrights and Peroxidase stain) median (25/75 percentiles) proportions of subpopulations from TB patients were 67% (54/83) alveolar macrophages 16% (9/22) alveolar lymphocytes 3% (2/17) neutrophils and 0% eosinophils. BAC subpopulations from CCs were 95% (88/97) alveolar macrophages 5% (3/12) alveolar lymphocytes 0% neutrophils and 0% eosinophils.

Table 1

Cell subpopulations in BACs and PBMCs. BACs or PBMCs (2×10^5 each) were surface-stained with PerCp (CD3), and FITC (CD4, CD8, CD56, γδTCR)-labeled anti-human monoclonal antibodies and analyzed by FACS analysis.

	CC (n = 13)		TB (n = 8)	
	BACs	PBMCs	BACs	PBMCs
# BACs/10 ml BALF [10^6]	1.4 (0.9–1.8)	–	2.3 (1.4–2.7)	–
% CD3 ⁺ BACs	5 (2–15)*	–	15 (8–26)	–
% CD3 ⁺ CD4 ⁺	48 (45–51)**	59 (56–66)**	79 (57–72)	62 (53–67)
% CD3 ⁺ CD8 ⁺	27 (17–38)	23 (15–27)	20 (15–28)	26 (18–27)
% CD3 ⁺ CD56 ⁺	10 (6–13)	3 (2–8)	7 (5–9)	7 (5–8)
% CD3 ⁺ CD56 ⁺	4 (3–6)	14 (10–21)**	3 (3–4)	16 (13–20)**
% CD3 ⁺ γδTCR ⁺	7 (3–10)*	3 (2–5)**	5 (4–7)	5 (4–7)

Lymphocytes in BACs and PBMCs were assessed in a CD3⁺ vs. SSC gate and NK cells in an FSC vs. SSC gate using Cell Quest software. Except for BAC numbers in BALF, values represent median percentages of CD3⁺ T cells or NK cells within BACs and PBMCs (bold numbers) and 25 and 75 percentiles (in parentheses). Significances: * $p \leq 0.05$, CCs vs. TB in BACs; ** $p \leq 0.05$, BACs vs. autologous PBMCs (Mann–Whitney U-test).

3.2. CD4⁺ T cells are the principal T cell subpopulation in the BACs of TB patients

One of the aims of the current study was to assess cellularity, phenotype and activation status of BACs during active TB (Table 1). Using FACS analysis in the current study, we confirmed earlier findings¹⁶ of a lymphocytic alveolitis with a 3-fold increased proportion and 4.5-fold increased absolute number of T cells in BACs from TB patients compared with BACs from CCs ($p \leq 0.05$, Table 1). A novel finding was that proportions of alveolar CD4⁺ T cells were significantly higher in BACs from TB patients than in BACs from CCs (median % 70 vs. 48, $p \leq 0.05$). Proportions of alveolar and peripheral CD8⁺ T cells were similar in both study groups (median % BACs vs. PBMCs: TB, 20 vs. 26 and CCs, 27 vs. 23, respectively), and significantly lower than that of alveolar and peripheral CD4⁺ T cells ($p \leq 0.001$). Other T cell subpopulations and NK (CD3⁺CD56⁺) cells are presented in Table 1.

3.3. CD4⁺ T cells with memory phenotype are the principal source of IFN-γ in the bronchoalveolar compartment during active TB

Next the phenotype of IFN-γ-producing alveolar T cell subpopulations was assessed by FACS analysis (Figure 1). Proportions of constitutively (unstimulated) IFN-γ-producing alveolar T cells were low and comparable in BACs from TB patients (median 4%) and CC (median 1%). However, upon *in vitro* stimulation with PPD and *M.tb.*, pulmonary compartmentalization of antigen-specific T cell responses was clearly demonstrated in TB patients in whom proportions of antigen-specific IFN-γ-producing alveolar CD4⁺ T cells were significantly larger than in CC (median % TB vs. CC: PPD, 46 vs. 6 and *M.tb.*, 37 vs. 4, $p \leq 0.05$) (Figure 1A). We also assessed the contribution of CD45RO⁺ alveolar T cells to the production of IFN-γ, as the prominent PPD- and *M.tb.*-specificity in TB patients suggested presence of increased local memory immunity. Indeed, proportions of both PPD- and *M.tb.*-specific CD4⁺CD45RO⁺ and CD8⁺CD45RO⁺ IFN-γ-producing alveolar T cells were significantly ($p \leq 0.05$) increased in TB patients compared with CCs (Figure 1F) despite similar proportions of CD4⁺ and CD8⁺ alveolar T cells with memory phenotype (CD45RO⁺) in TB patients and CCs (data not shown).

Alveolar CD8⁺, γδTCR⁺, CD3⁺CD56⁺ and NK cells also contributed to the local production of IFN-γ and were increased in proportion (CD8⁺ [PPD] and NK [*M.tb.*], $p \leq 0.05$) in TB patients compared with CCs (Figure 1B–E). The proportions of peripheral IFN-γ-producing T cell subpopulations and NK cells (median < 10%) were significantly lower ($p < 0.05$) in both study groups than within their respective autologous BACs.

3.4. Increased IFN-γ-production in the bronchoalveolar compartment during active TB

To assess antigen-specific and IL-12R-mediated IFN-γ-production in the bronchoalveolar and systemic compartments during active TB, BACs and PBMCs were stimulated with PPD, live *M.tb.* (MOI 10), rhIL-12, and rhIL-12 plus PHA (Figure 2). IFN-γ-protein and IFN-γ mRNA expression were determined by ELISA and qRT-PCR, respectively. To account for differences in alveolar T cell numbers within the BACs from TB patients and CC subjects (TB patients BAC were characterized by a lymphocytic alveolitis), IFN-γ mRNA amounts in BACs were normalized as described in the "Material and methods" section. Constitutive (culture medium-stimulated) IFN-γ-production was significantly increased in BACs from TB patients (median ng/mL TB 0.9 and CC 0, $p \leq 0.05$). Upon stimulation with PPD and live *M.tb.* IFN-γ-production from BACs of TB patients increased to levels that were significantly higher than that from BACs of CCs (median ng/mL TB vs. CC: PPD, 7.4 vs. 0.04; *M.tb.* 10, 4.6 vs. 0.1, $p \leq 0.05$) (Figure 2A). In contrast to the findings

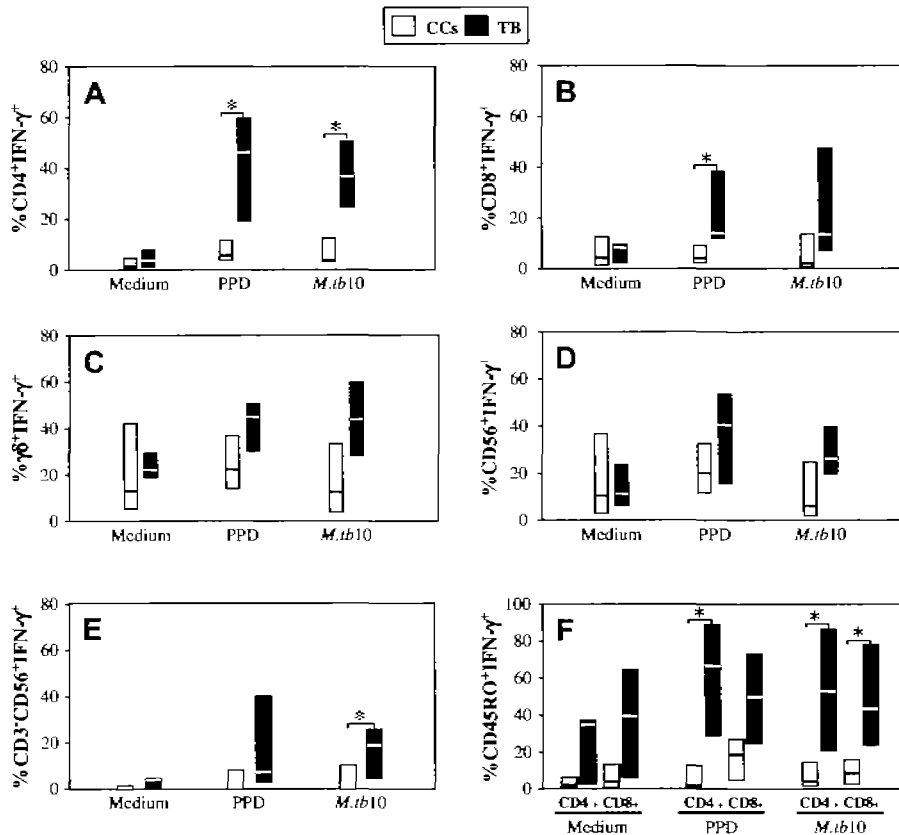


Figure 1. IFN- γ -producing BAC subpopulations. BACs (2×10^6) were stimulated with 10 μ g PPD or with *M.tb* H37Ra (MOI 10) for 12 h in the presence of Brefeldin A, and subsequently surface-stained with PerCP (CD3, CD4, CD8) and FITC (CD4, CD8, CD56, $\gamma\delta$ TCR, CD45RO)-labeled anti-human monoclonal antibodies. Intracellular staining was done using an anti-human IFN- γ PE monoclonal antibodies. IFN- γ -producing cells were assessed in CD3⁺ vs. SSC (A–D, F) or FSC vs. SSC (E) gates using Cell Quest software. Panels (A)–(F) represent median percentages (horizontal black and white lines) and 25 and 75 percentiles (vertical bars) of IFN- γ -producing BAC subpopulations. Panels (A) CD4⁺ [CCs, n = 10; TB, n = 7]; (B) CD8⁺ [CCs, n = 10; TB, n = 7]; (C) $\gamma\delta$ TCR⁺ [CCs, n = 8; TB, n = 7]; (D) CD56⁺ [CCs, n = 8; TB, n = 7]; (E) CD3⁺CD56⁺ [CCs, n = 8; TB, n = 7] and (F) memory (CD45RO⁺)CD4⁺ and CD8⁺ [CCs, n = 4; TB, n = 4]. Significance: * $p \leq 0.05$, CCs vs. TB (Mann–Whitney U-test).

in BACs from TB patients, constitutive IFN- γ -production levels were lower in autologous PBMCs (median ng/mL BACs vs. PBMCs: 0.9 vs. 0.015, $p \leq 0.05$) (Figure 2C).

To assess induction of IFN- γ -production through direct engagement of the IL-12R, BACs and PBMCs from TB patients and CCs were *in vitro* stimulated with rhIL-12 or a combination of rhIL-12 plus PHA. Stimulation with rhIL-12 and rhIL-12 + PHA induced significantly higher IFN- γ levels in BACs from TB patients than in BACs from CCs (median ng/mL TB vs. CC: rhIL-12, 1.3 vs. 0.06, rhIL-12 + PHA 16.5 vs. 2, $p \leq 0.05$).

We also assessed IFN- γ mRNA levels by qRT-PCR in the BACs samples that were studied for IFN- γ -protein production. Constitutive IFN- γ mRNA copy numbers in BACs from TB patients were significantly increased compared with that in BACs from CCs (median copy number/60 ng cDNA TB vs. CCs: 80 vs. 2, $p \leq 0.05$) (Figure 2B). Similar to our findings of increased antigen-specific IFN- γ -protein production in patients with TB, stimulation of BACs with PPD or live *M.tb*, induced a significant increase of IFN- γ mRNA copy numbers in the TB group (median copy number/60 ng cDNA TB vs. CCs: PPD, 806 vs. 6; *M.tb* 10, 488 vs. 10). Stimulation with rhIL-12 or rhIL-12 plus PHA resulted in comparable IFN- γ mRNA copy numbers in BACs of both groups (Figure 2B).

In contrast to the observed study group differences in BACs, constitutive and PPD-induced IFN- γ levels were similar in autologous PBMCs from both study groups. IFN- γ copy numbers in PBMCs from CCs were, however, significantly higher in response to live *M.tb* and PHA plus rhIL-12 than that in TB patients (Figure 2D).

In summary, the data demonstrate local accumulation in TB patients of live *M.tb*-responsive cells with the capacity to produce IFN- γ .

3.5. IL-12p70 production in response to live *M.tb*

To further explore the observed increased local production of IFN- γ in TB patients, we determined IL-12p70 concentrations in culture supernatants from BACs and PBMCs of TB patients and CCs. IL-12p70 protein production from BACs of TB patients was significantly increased in response to live *M.tb* in BACs from TB patients compared with CC (Figure 3A). In contrast, in culture supernatants from PBMCs IL-12p70 concentrations were similar between both study groups (Figure 3B).

3.6. IL-12R β 1 and IL-12R β 2 expression in BACs and PBMCs during active TB

IL-12R β 1 and IL-12R β 2 mRNA expression were assessed by qRT-PCR and found to be similar in the study groups both constitutively and following stimulation with PPD and live *M.tb* (Figure 4).

3.7. IFN- γ R1 expression in BACs and PBMCs

To assess if antigen-specific IFN- γ -production during TB could mediate macrophage activation, we assessed the expression of IFN- γ R1 mRNA (one of the two subunits of the IFN- γ R) in BACs and

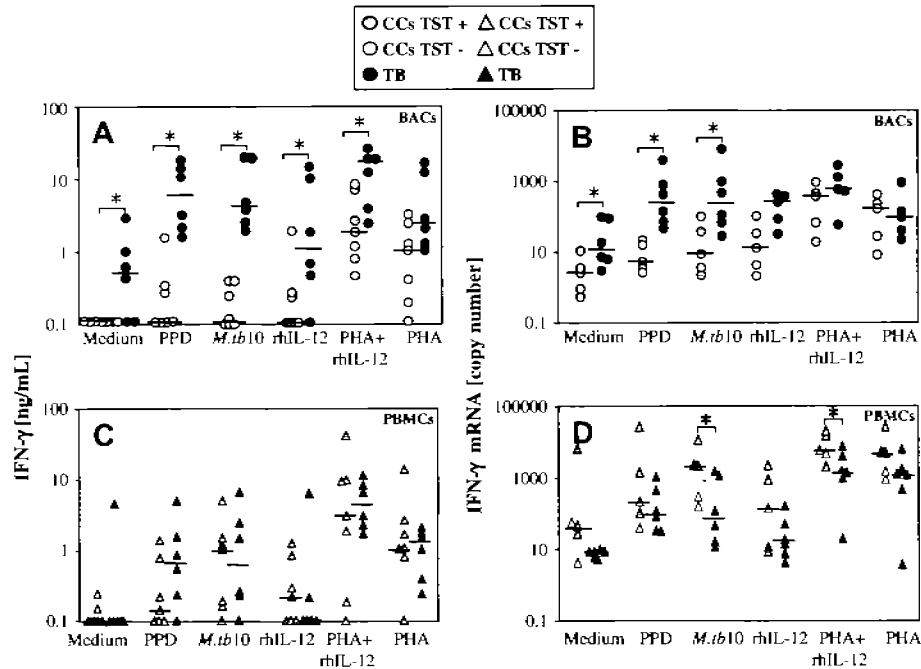


Figure 2. IFN- γ -protein production and mRNA expression of BACs and PBMCs. BACs or PBMCs (10^6 each) were stimulated with 10 μ g PPD, 5 ng rhIL-12, 5 μ g PHA plus 5 ng rhIL-12, or 5 μ g PHA (1 mL final concentration) or with *M.tb* H37Ra (MOI 10) for 24 h. IFN- γ -protein production was determined in culture supernatants by ELISA (ng/mL); panels (A) BACs and (C) PBMCs [(A, C): CCs, $n = 7$ (TST + $n = 4$, TST - $n = 3$); TB, $n = 6$]. IFN- γ mRNA expression was assessed by qRT-PCR (copy numbers/60 ng of cDNA); panels (B) BACs and (D) PBMCs [(B, D): CCs, $n = 5$ (TST + $n = 3$, TST - $n = 2$); TB, $n = 6$]. IFN- γ mRNA expression data are normalized to account for differences in alveolar T cell proportions in BACs from TB patients and CCs. Significance: * $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney *U*-test).

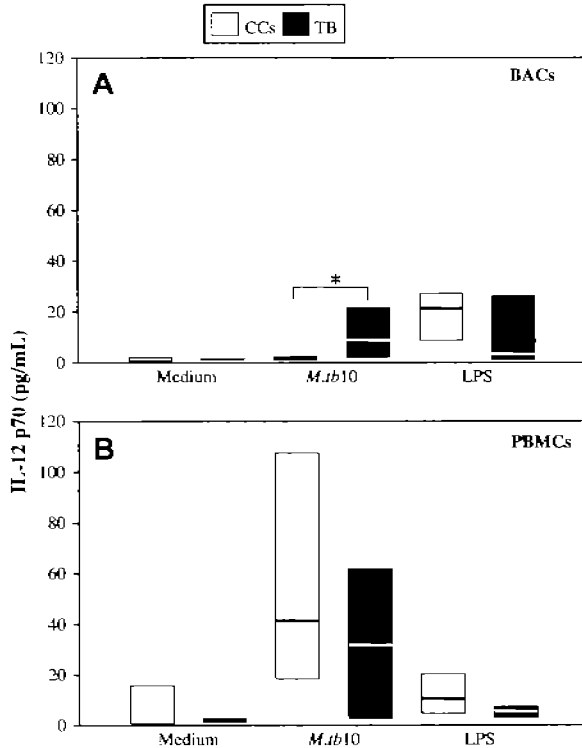


Figure 3. IL-12p70 protein production in BACs and PBMCs. BACs or PBMCs (10^6 each) was stimulated with *M.tb* (MOI 10) or with 5 μ g LPS (1 mL final concentration) for 24 h. IL-12p70 production was determined in culture supernatants by Multiplex Bead Array Assay. Panels A and B represent median (horizontal black and white lines) and 25 and 75 percentiles (vertical bars) of IL-12p70 concentrations (pg/mL); panels (A) BACs [CCs, $n = 5$; TB, $n = 6$] and (B) PBMCs [CCs, $n = 7$; TB, $n = 6$]. Significance: * $p \leq 0.05$ (the Mann-Whitney *U*-test).

PBMCs. Expression levels of IFN- γ R1 mRNA were similar in BACs from TB patients and CCs both constitutively and after stimulation with PPD, rhIFN- γ , LPS or with live *M.tb* (MOI 10) (Figure 5A). In PBMCs from TB patients, constitutive IFN- γ R1 mRNA expression was significantly higher than in CCs ($p < 0.05$). After stimulation with PPD or live *M.tb*, IFN- γ R1 mRNA expression appeared to be down-regulated compared to constitutive levels in TB patients. In CCs, no change of IFN- γ R1 mRNA expression levels was seen following stimulation with PPD, *M.tb* or rhIFN- γ (Figure 5B). We also assessed TNF- α expression (protein and mRNA) in BACs and PBMCs from the study groups (data not shown). There were no significant differences between the TNF- α concentrations in stimulated and unstimulated BACs and neither were there significant differences in PBMCs from both TB patients and CCs.

3.8. Immunosuppressive cytokines in BAC and PBMC culture supernatants and BAL fluid

To assess cytokines described to be involved in suppression of *M.tb*-specific immune responses we analyzed concentrations of IL-4, IL-9 and IL-10 in 24-h culture supernatants of BACs and PBMCs. *M.tb* stimulation (MOI 10) induced significantly increased IL-4 levels in supernatants from BACs of TB patients compared to that in CC ($p < 0.05$) (Figure 6A). There were no significant differences between IL-9 and IL-10 concentrations in BACs and PBMCs of patients and controls (data not shown). Higher levels of TGF- β were observed in BAL fluids from TB patients in comparison with CCs although differences were not significant (data not shown).

4. Discussion

To further analyze the constituents of local Th1 immunity and expression of immunosuppressive cytokines during pulmonary TB, this study assessed the phenotype of IFN- γ -producing alveolar T

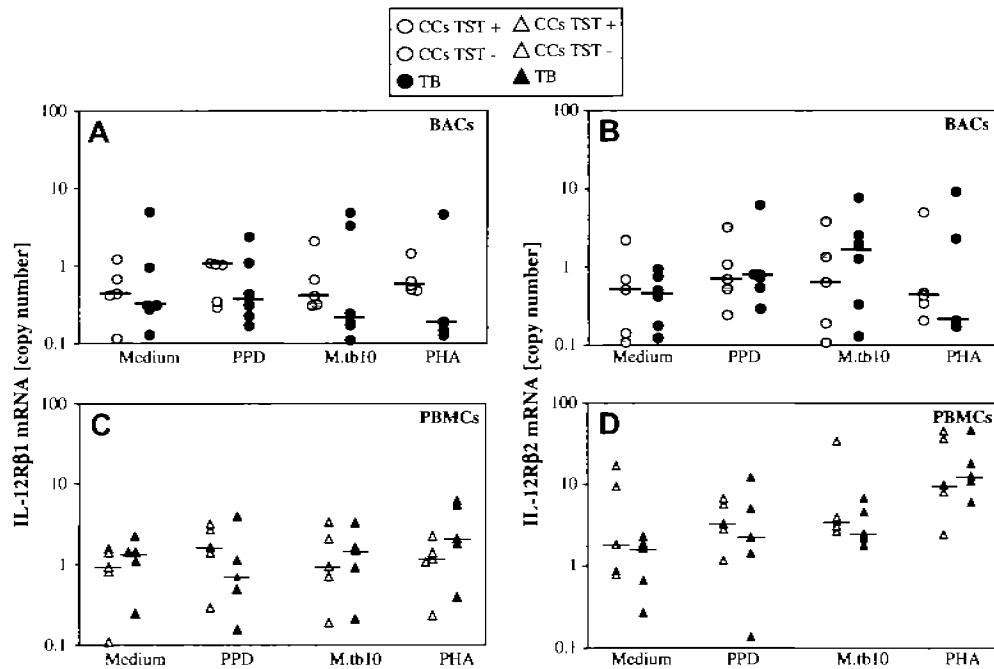


Figure 4. IL-12R β 1 and IL-12R β 2 mRNA expression in BACs and PBMCs. BACs or PBMCs (10^6 each) were stimulated with 10 μ g PPD, or 2.5 μ g PHA (final concentration) or with *M.tb* (MOI 10) for 24 h. Expression of IL-12R β 1 and IL-12R β 2 was assessed by qRT-PCR. IL-12R β 1 mRNA expression (copy numbers/60 ng cDNA); panels (A) BACs and (C) PBMCs [(A, C): CCs, $n = 5$ (TST + $n = 3$, TST - $n = 2$); TB, $n = 6$]. IL-12R β 2 mRNA expression (copy numbers/60 ng cDNA); panels (B) BACs and (D) PBMCs [(B, D): CCs, $n = 5$ (TST + $n = 3$, TST - $n = 2$); (B) TB, $n = 6$; (D) TB, $n = 5$]. IL-12R β 1 and IL-12R β 2 mRNA expression data are normalized to account for differences in alveolar T cell proportions in BACs from TB patients and CCs.

cells, the expression of IFN- γ , IL-12R β 1, IL-12R β 2, IFN- γ R1 and TNF- α mRNA and of IL-4, IL-9, IL-10 and TGF- β in BACs from the bronchoalveolar spaces of radiographically affected lung segments of patients with active pulmonary TB. Our data provide evidence that compartmentalized bronchoalveolar immune responses during TB do not result solely from sequestration of cells to the infection site and increased local T cell numbers, but also from an increased 'responsiveness' of these resident alveolar T cells during active TB disease.

Seventy percent (median) of the alveolar T cells of TB patients are CD4 $^+$ and more than 46% (median) of these cells secrete IFN- γ upon *in vitro* stimulation with PPD or live *M.tb* demonstrating that alveolar CD4 $^+$ T cells are the principal source of local bronchoalveolar antigen-specific IFN- γ -production during TB. Alveolar CD8 $^+$, $\gamma\delta$ T, CD3 $^-$ CD56 $^+$ as well as CD3 $^-$ CD56 $^+$ (NK) cells contribute to the local production of *M.tb*-induced IFN- γ , although to a much lesser degree than CD4 $^+$ T cells. Our findings in TB patients coincide with a report in which PPD-induced IFN- γ -production by CD4 $^+$ T cells in BAL fluid of TB patients was found to be higher than in autologous blood cells⁵² and contrast those from Taha et al.²¹ who reported increased proportions of alveolar CD8 $^+$ T cells that expressed IFN- γ mRNA constitutively in TB patients. It is possible that this difference is based on dissimilarities in the stages of TB disease in the study populations and the experimental approaches used to determine the cellular source of IFN- γ (FACS analysis vs. *in situ* hybridization²¹).

We also assessed the proportions of PPD-, and *M.tb*-specific IFN- γ -producing alveolar memory T cells and found that CD4 $^+$ CD45RO $^+$ and CD8 $^+$ CD45RO $^-$ BACs are significantly increased in TB patients. This finding is consistent with the observed enhanced antigen-specific IFN- γ recall responses in TB patient's BACs.

Our findings in BACs of TB patients provide evidence for a highly increased compartmentalized constitutive and *M.tb*-induced/specific production of IFN- γ that is paralleled by significantly

increased proportions of activated alveolar T cells (median 40% CD69 $^+$, data not shown) at the infection site.

The increased IL-12p70 levels in response to stimulation with live *M.tb* in BACs from TB patients in our study positively correlate with the observed highly increased local IFN- γ -production, and suggest *M.tb*-induced macrophage and/or dendritic cell activation in the bronchoalveolar spaces. This observation coincides with high constitutive levels of IL-12p70 in BAL fluid from pulmonary TB patients⁵³ and a report of increased levels of IL-12p40 compared to autologous serum in pleural fluid of patients with TB pleurisy, which, however, is a self-limiting disease and thus rather a model of protective immunity.⁵⁴

To further examine the apparent lack of IFN- γ -mediated growth control of *M.tb* in the bronchoalveolar spaces during active disease (demonstrated by the shedding of viable *M.tb* into the airways of untreated pulmonary TB patients), we also assessed the constitutive and stimulated IL-12R β 1, IL-12R β 2 and IFN- γ R1 expression, i.e. additional components of Th1 immunity. There were no significant differences found or patterns recognized in regards to the expression of these receptors after normalization for alveolar lymphocyte numbers when BACs and PBMCs were compared between the study groups. Prior to lymphocyte normalization, however, total constitutive IL-12R β 1 and IL-12R β 2 mRNA expression in BACs were significantly increased in the TB patient group. Earlier studies by Taha demonstrated *ex vivo* increased IL-12R β 1 and IL-12R β 2 mRNA expression in alveolar CD8 $^+$ T cells from active pulmonary TB patients; however, the data were not normalized to account for lymphocytic alveolitis in TB patients.⁵⁵ The increased IFN- γ R1 mRNA expression in PBMCs from our TB patients contradicts a study by Singhal et al.⁵⁶ which showed reduced surface expression of IFN- γ R1 on PBMCs from TB patients. Post-translational regulatory mechanisms that interfere with IFN- γ R1 protein expression and differences in the IFN- γ R1 study time points, however, may explain this difference.

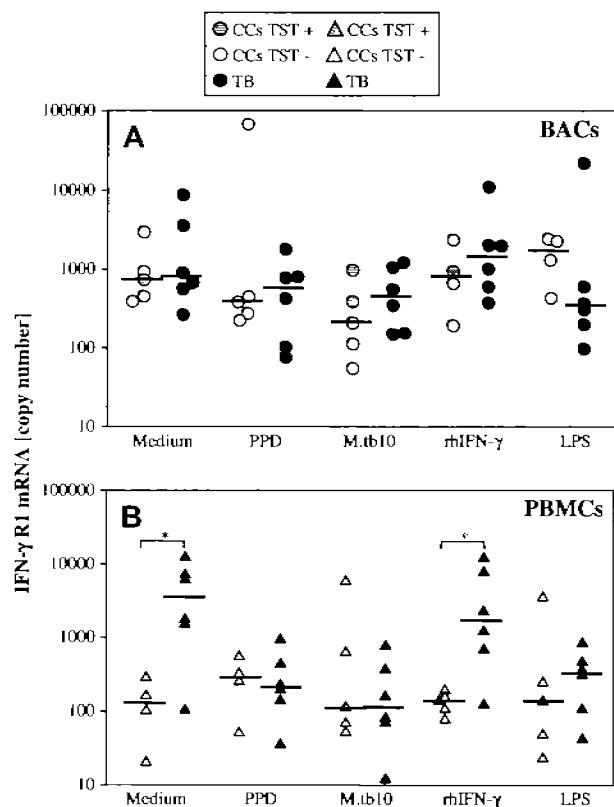


Figure 5. IFN- γ R1 mRNA expression in BACs and PBMCs. BACs or PBMCs (10^6 each) were stimulated with 10 μ g PPD, *M.tb* H37Ra (MOI 10), 100 U rhIFN- γ , and 5 μ g LPS (1 mL final concentration) for 24 h. Expression of IFN- γ R1 mRNA was assessed by qRT-PCR. IFN- γ R1 mRNA expression (copy numbers/60 ng of cDNA): panels (A) BACs and (B) PBMCs ((A, B): CCs, $n = 5$ (TST + $n = 3$, TST - $n = 2$); TB, $n = 6$). IFN- γ R1 mRNA expression data are normalized to account for differences in alveolar macrophages proportions in BACs from TB patients and CC. Significance: * $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney U-test).

Altogether, the induction of IFN- γ production and the release of IFN- γ from BACs of TB patients appear to occur unimpeded when compared with autologous PBMCs and BACs from CCs. Lack of *M.tb* growth control in the bronchoalveolar spaces during TB may therefore not be due to lack of IFN- γ production or impaired IL-12R-mediated IFN- γ induction. Our group's earlier findings in aerogenically *M.tb*-exposed healthy household contacts of patients with TB support this conclusion, in that IFN- γ levels in cocultures of alveolar macrophages with CD4⁺ and CD8⁺ T cells did not correlate with the superior CD8⁺ T cell-mediated *M.tb* growth control.⁵⁷ Additionally, treatment of patients with multidrug resistant TB with aerosolized rhIFN- γ does not lead to sputum sterilization and results in only transient effects on *M.tb* growth control.⁵⁸ Thus, although IFN- γ is an indispensable activator of macrophage-mediated killing of *M.tb*, IFN- γ -induced protective antimycobacterial/bactericidal effector mechanisms appear to be impaired in patients with TB.

The apparent failure to control *M.tb* growth during active TB disease could be caused by a number of factors, including local immunosuppression or *M.tb*-induced immune evasion. Production of immunosuppressive cytokines may modulate and subvert the antimycobacterial effects of IFN- γ on macrophages. The significantly increased IL-4 levels observed in supernatants of BACs from TB patient observed in the current study support the notion of local immunosuppression and complements with earlier findings in BAL material from TB patients.^{18,59} In addition the current study shows a trend towards increased levels of IL-9 and IL-10 in BAC

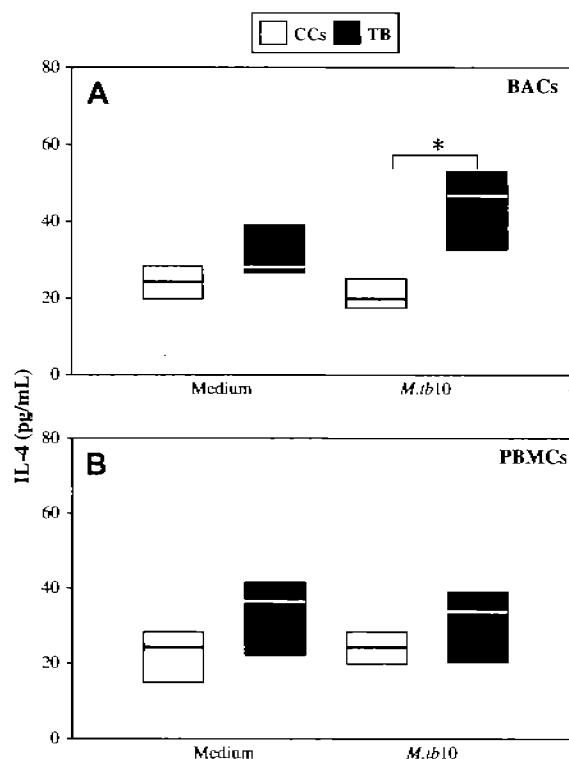


Figure 6. IL-4 protein production in BACs and PBMCs. BACs or PBMCs (10^6 each) were stimulated with *M.tb* (MOI 10) for 24 h. IL-4 production was determined in culture supernatants by Multiplex Bead Array Assay. Panels A and B represent median (horizontal black and white lines) and 25 and 75 percentile (vertical bars) IL-4 concentrations (pg/mL): panels (A) BACs [CCs, $n = 5$; TB, $n = 6$] and (B) PBMCs [CCs, $n = 7$; TB, $n = 6$]. Significance: * $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney U-test).

supernatants and for TGF- β in unconcentrated BAL fluid from patients with TB, compared to CCs (data not shown).

Further, more in a recent study of untreated TB patients, surface expression of IFN- γ R1 was decreased on fresh PBMCs (but could be restored following antituberculous therapy).⁵⁶ In rare cases autoantibodies directed against IFN- γ ⁶⁰ or increased systemic IL-9 levels⁶¹ have been shown to interfere with IFN-g-induced protective effects. Other immunosuppressive (and thus *M.tb* growth-promoting) mechanisms may be operative such as immunoregulation by regulatory T cells in the bronchoalveolar compartment during *M.tb* infection.⁶²

Efficient macrophage function may also be impaired directly by *M.tb* or its products. *M.tb* reduces CD1 expression⁶³ and induction of IFN- γ -induced genes such as CD64 (Fc γ R1) in THP1 cells⁶⁴ and inhibits IL-12 production and MHC class II presentation pathways in human macrophages.^{65–69}

The current study has limitations that are associated with the complex subject recruitment processes for research in the lung compartment of human volunteers. This limitation accounts for the relatively small study subject numbers and may affect variability and comparisons and perhaps underestimate phenotypic and functional differences between BACs and PBMCs from TB patients and CCs. Utilization of virulent *M.tb* H37Rv or of clinical *M.tb* isolates for *in vitro* stimulation studies may produce different results from those obtained here with *M.tb* H37Ra.

In conclusion, functional responses to *M.tb* of immune cells in the bronchoalveolar compartment of TB patients appear to be preserved fully as regards to induction, production and release of IFN- γ and IL-12 and differ significantly from those in the autologous systemic compartment. Uncontrolled *M.tb* infection despite enhanced Th1 immunity suggests that the local IFN- γ release from CD4⁺ and CD8⁺

T cells and IL-12 production is insufficient to confer protective immunity and that additional molecules, cell types and/or molecular mechanisms are required for immunological protection.

Our finding of increased IL-4 production in BACs from TB patients together with earlier studies from Fletcher, Dheda, and Seah^{59,70–73} warrants further efforts to determine whether, suppressive and immunoregulatory mechanisms, that interfere locally with *M.tb* growth are the cause or consequence of TB disease. Unraveling such mechanisms will have important implications for the assessment of new antituberculous vaccine candidates, as these ought to generate protection at the entry site of *M.tb*; the human lung. Whereas the assessments of IFN- γ -induction *in vitro* and of immune responses in the systemic compartment may be useful for the evaluation of vaccine immunogenicity, they do not correlate with local pulmonary protective antimycobacterial immunity. Therefore, the identification of new vaccine candidates on the basis of their ability to induce *M.tb*-specific IFN- γ responses may not be a prudent approach. Induction of protective lung immunity may require new application routes and antituberculous vaccines that differ from those conventionally assessed through the study of systemic immunity. Lung immune responses may provide unique read-outs of TB vaccine efficacy and immunogenicity that may be missed interrogating systemic immunity alone.

Acknowledgments

This work was supported by grant 2R01HL51630-10 from National Heart Lung and Blood Institute (NHLBI). We are grateful to Padmini Salgame PhD for careful review of this manuscript. We also would like to express our gratitude to the study participants (patients and controls) and their families for participating in this study and to Dr. Karen Bobadilla, Leticia Sanchez (nurse), Silvia del Arenal and Ma.Carmen Sarabia (laboratory technicians) for their expertise and help. Thanks also to the program 'Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México' that supported the graduate work of M.T. Herrera.

Funding: None.

Competing interest: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

- Bates JH. Transmission and pathogenesis of tuberculosis. *Clin Chest Med* 1980;1:167–74.
- Sodhi A, Gong J, Silva C, Qian D, Barnes PF. Clinical correlates of interferon gamma production in patients with tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1997;25:617–20.
- Hirsch CS, Toossi Z, Othieno C, Johnson JL, Schwander SK, Robertson S, et al. Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. *J Infect Dis* 1999;180:2069–73.
- 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*. *Infect Immun* 1998;66:176–80.
- Ellner JJ. Suppressor adherent cells in human tuberculosis. *J Immunol* 1978;121:2573–9.
- Ellner JJ. Regulation of the human immune response during tuberculosis. *J Lab Clin Med* 1997;130:469–75.
- Fujiwara H, Kleinhenz ME, Wallis RS, Ellner JJ. Increased interleukin-1 production and monocyte suppressor cell activity associated with human tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1986;133:73–7.
- Toossi Z, Kleinhenz ME, Ellner JJ. Defective interleukin 2 production and responsiveness in human pulmonary tuberculosis. *J Exp Med* 1986;163:1162–72.
- Hirsch CS, Hussain R, Toossi Z, Dawood G, Shahid F, Ellner JJ. Cross-modulation by transforming growth factor beta in human tuberculosis: suppression of antigen-driven blastogenesis and interferon gamma production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:3193–8.
- Zhang M, Lin Y, Iyer DV, Gong J, Abrams JS, Barnes PF. T-cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995;63:3231–4.
- Hirsch CS, Yoneda T, Averill L, Ellner JJ, Toossi Z. Enhancement of intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes by transforming growth factor-beta 1. *J Infect Dis* 1994;170:1229–37.
- Othieno C, Hirsch CS, Hamilton BD, Wilkinson K, Ellner JJ, Toossi Z. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis*-induced transforming growth factor beta1 and interleukin-10. *Infect Immun* 1999;67:5730–5.
- Hirsch CS, Ellner JJ, Blinkhorn R, Toossi Z. *In vitro* restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against *Mycobacterium tuberculosis* by natural inhibitors of transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3926–31.
- Toossi Z, Gogate P, Shiratsuchi H, Young T, Ellner JJ. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions. *J Immunol (Baltimore, Md.: 1950)* 1995;154:465–73.
- Schwander SK, Sada E, Torres M, Escobedo D, Sierra JG, Alt S, et al. T lymphocytic and immature macrophage alveolitis in active pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 1996;173:1267–72.
- Schwander SK, Torres M, Sada E, Carranza C, Ramos E, Tary-Lehmann M, et al. Enhanced responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens by human alveolar lymphocytes during active pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 1998;178:1434–45.
- Condos R, Rom WN, Liu YM, Schluger NW. Local immune responses correlate with presentation and outcome in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:729–35.
- Mazzarella G, Bianco A, Perna F, D'Auria D, Grella E, Moscarello E, et al. T lymphocyte phenotypic profile in lung segments affected by cavitary and non-cavitary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2003;132:283–8.
- Ribeiro-Rodrigues R, Resende CT, Johnson JL, Ribeiro F, Palaci M, Sa RT, et al. Sputum cytokine levels in patients with pulmonary tuberculosis as early markers of mycobacterial clearance. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:818–23.
- Aubert-Pivert EM, Chedevergne FM, Lopez-Ramirez GM, Colle JH, Scheinmann PL, Gicquel BM, et al. Cytokine transcripts in pediatric tuberculosis: a study with bronchoalveolar cells. *Tuber Lung Dis* 2000;80:249–58.
- Taha RA, Kotsimbos TC, Song YL, Menzies D, Hamid Q. IFN-gamma and IL-12 are increased in active compared with inactive tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1135–9.
- Giacomini E, Iona E, Ferroni L, Miettinen M, Fattorini L, Orefici G, et al. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J Immunol* 2001;166:7033–41.
- Yin XJ, Schafer R, Ma JY, Antonini JM, Weissman DD, Siegel PD, et al. Alteration of pulmonary immunity to *Listeria monocytogenes* by diesel exhaust particles (DEPs). I. Effects of DEPs on early pulmonary responses. *Environ Health Perspect* 2002;110:1105–11.
- Yin XJ, Schafer R, Ma JY, Antonini JM, Roberts JR, Weissman DN, et al. Alteration of pulmonary immunity to *Listeria monocytogenes* by diesel exhaust particles (DEPs). II. Effects of DEPs on T-cell-mediated immune responses in rats. *Environ Health Perspect* 2003;111:524–30.
- Rich EA, Panuska JR, Wallis RS, Wolf CB, Leonard ML, Ellner JJ. Dyscoordinate expression of tumor necrosis factor-alpha by human blood monocytes and alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:1010–6.
- Law K, Weiden M, Harkin T, Tchou-Wong K, Chi C, Rom WN. Increased release of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:799–804.
- Vankayalapati R, Wüzel B, Lakey DL, Zhang Y, Coffee KA, Griffith DE, et al. T cells enhance production of IL-18 by monocytes in response to an intracellular pathogen. *J Immunol* 2001;166:6749–53.
- Zissel G, Baumer J, Schlaak M, Müller-Quernheim J. *In vitro* release of interleukin-15 by broncho-alveolar lavage cells and peripheral blood mononuclear cells from patients with different lung diseases. *Eur Cytokine Netw* 2000;11:105–12.
- Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:495–521.
- Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3:133–46.
- Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:361–8.
- Desai BB, Quinn PM, Wolitzky AG, Mongini PK, Chizzonite R, Gately MK. IL-12 receptor. II. Distribution and regulation of receptor expression. *J Immunol* 1992;148:3125–32.
- Presky DH, Minetti LJ, Gillissen S, Wilkinson VL, Wu CY, Gubler U, et al. Analysis of the multiple interactions between IL-12 and the high affinity IL-12 receptor complex. *J Immunol* 1998;160:2174–9.
- Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu CY, et al. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14002–7.
- Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U, et al. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* 1997;185:825–31.

36. Rogge I, Papi A, Presky DH, Biffi M, Minetti LJ, Miotto D, et al. Antibodies to the IL-12 receptor beta 2 chain mark human Th1 but not Th2 cells *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol* 1999;162:3926–32.
37. Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 1997;185:817–24.
38. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997;15:749–95.
39. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 1993;178:2243–7.
40. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 1993;178:2249–54.
41. Altare F, Duraud A, Lammis D, Emile JF, Lambhamedi S, Le Deist F, et al. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* 1998;280:1432–5.
42. Altare F, Ensser A, Breiman A, Reichensbach J, Baghdadi JE, Fischer A, et al. Interleukin-12 receptor beta1 deficiency in a patient with abdominal tuberculosis. *J Infect Dis* 2001;184:231–6.
43. Fieschi C, Dupuis S, Catherinot E, Feinberg J, Bustamante J, Breimau A, et al. Low penetrance, broad resistance, and favorable outcome of interleukin 12 receptor beta1 deficiency: medical and immunological implications. *J Exp Med* 2003;197:527–35.
44. van de Vosse E, Hoeve MA, Ottenhoff TH. Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect Dis* 2004;4:739–49.
45. Jouanguy E, Lambhamedi-Cherradi S, Altare F, Fondaneche MC, Tuerlinckx D, Blanche S, et al. Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid bacillus Calmette–Guerin infection and a sibling with clinical tuberculosis. *J Clin Invest* 1997;100:2658–64.
46. Jouanguy E, Altare F, Lambhamedi-Cherradi S, Casanova JL. Infections in IFNGR1-deficient children. *J Interferon Cytokine Res* 1997;17:583–7.
47. Caragol I, Raspall M, Fieschi C, Feinberg J, Larrosa MN, Hernandez M, et al. Clinical tuberculosis in 2 of 3 siblings with interleukin-12 receptor beta1 deficiency. *Clin Infect Dis* 2003;37:302–6.
48. Picard C, Fieschi C, Altare F, Al Jumaah S, Al Hajjar S, Feinberg J, et al. Inherited interleukin-12 deficiency: IL12B genotype and clinical phenotype of 13 patients from six kindreds. *Am J Hum Genet* 2002;70:336–48.
49. Classification of pulmonary tuberculosis. In: *Diagnostic standards and classification of tuberculosis*. New York: National Tuberculosis and Respiratory Disease Association; 1969. p. 68–74.
50. Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol* 1976;(Suppl. 5):9–15.
51. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–9.
52. Barry SM, Lipman MC, Bannister B, Johnson MA, Janossy G. Purified protein derivative-activated type 1 cytokine-producing CD4+ T lymphocytes in the lung: a characteristic feature of active pulmonary and nonpulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 2003;187:243–50.
53. Morosini M, Meloni F, Marone BA, Paschetto E, Uccelli M, Pozzi E, et al. The assessment of IFN-gamma and its regulatory cytokines in the plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003;7:994–1000.
54. Zhang M, Gately MK, Wang E, Gong J, Wolf SF, Lu S, et al. Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *J Clin Invest* 1994;93:1733–9.
55. Taha RA, Minshall EM, Olivenstein R, Ihaku D, Wallaert B, Tscopoulou A, et al. Increased expression of IL-12 receptor mRNA in active pulmonary tuberculosis and sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1119–23.
56. Singhal A, Jaiswal A, Arora VK, Prasad HK. Modulation of interferon gamma receptor 1 by *Mycobacterium tuberculosis*: a potential immune evasive mechanism. *Infect Immun* 2007.
57. Carranza C, Juarez E, Torres M, Ellner JJ, Sada E, Schwander SK. *Mycobacterium tuberculosis* growth control by lung macrophages and CD8 cells from patient contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;173:238–45.
58. Condos R, Rom WN, Schluger NW. Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon-gamma via aerosol. *Lancet* 1997;349:1513–5.
59. Dheda K, Chang JS, Breen RA, Kim LU, Haddock JA, Huggett JF, et al. *In vivo* and *in vitro* studies of a novel cytokine, interleukin 4delta2, in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:501–8.
60. Kampmann B, Hemingway C, Stephens A, Davidson R, Goodall A, Anderson S, et al. Acquired predisposition to mycobacterial disease due to autoantibodies to IFN-gamma. *J Clin Invest* 2005;115:2480–8.
61. Wu B, Huang C, Kato-Maeda M, Hopewell PC, Daley CL, Krensky AM, et al. IL-9 is associated with an impaired Th1 immune response in patients with tuberculosis. *Clin Immunol* 2007.
62. Ribeiro-Rodrigues R, Resende CT, Rojas R, Toossi Z, Dietze R, Boom WH, et al. A role for CD4+ CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2006;144:25–34.
63. Stenger S, Niazzi KR, Modlin RL. Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1998;161:3582–8.
64. Kincaid EZ, Ernst JD. *Mycobacterium tuberculosis* exerts gene-selective inhibition of transcriptional responses to IFN-gamma without inhibiting STAT1 function. *J Immunol* 2003;171:2042–9.
65. Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, Radolf JD, Belisle J, Golenbock DT, et al. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2001;167:910–8.
66. Pai RK, Pennini ME, Tobian AA, Canaday DH, Boom WH, Harding CV. Prolonged toll-like receptor signaling by *Mycobacterium tuberculosis* and its 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-induced regulation of selected genes in macrophages. *Infect Immun* 2004;72:6603–14.
67. Pennini ME, Pai RK, Schultz DC, Boom WH, Harding CV. *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa lipoprotein inhibits IFN-gamma-induced chromatin remodeling of MHC2TA by TLR2 and MAPK signaling. *J Immunol* 2006;176:4323–30.
68. 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;171:175–84.
69. Gehring AJ, Rojas RE, Canaday DH, Lakey DL, Harding CV, Boom WH. The *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-regulated HLA-DR and Fc gamma R1 on human macrophages through toll-like receptor 2. *Infect Immun* 2003;71:4487–97.
70. Fletcher HA, Owiafe P, Jeffries D, Hill P, Rook GA, Zumla A, et al. Increased expression of mRNA encoding interleukin (IL)-4 and its splice variant IL-4delta2 in cells from contacts of *Mycobacterium tuberculosis*, in the absence of *in vitro* stimulation. *Immunology* 2004;112:669–73.
71. Dheda K, Chang JS, Huggett JF, Kim LU, Johnson MA, Zumla A, et al. The stability of mRNA encoding IL-4 is increased in pulmonary tuberculosis, while stability of mRNA encoding the antagonistic splice variant, IL-4delta2, is not. *Tuberculosis (Edinburgh)* 2007;87:237–41.
72. Seah GT, Rook GA. IL-4 influences apoptosis of mycobacterium-reactive lymphocytes in the presence of TNF-alpha. *J Immunol* 2001;167:1230–7.
73. Seah GT, Scott GM, Rook GA. Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. *J Infect Dis* 2000;181:385–9.