



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

Alteración de la activación de Stat1 y c-Jun en los macrófagos de
pacientes con tuberculosis.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A:
HUGO ESQUIVEL SOLÍS
TUTOR: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL





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.

Agradecimientos:

Agradezco a la Dra. Yolanda López Vidal por haberme abierto las puertas de su laboratorio y su grupo de trabajo, por haberme permitido crecer bajo su dirección y encontrar en el camino una enorme oportunidad de aprendizaje.

Agradezco también a mis compañeros y amigos del Programa de Inmunología Molecular Microbiana, de la Facultad de Medicina de la UNAM, por su camaradería, compromiso y compañerismo en todas las ocasiones que convivimos dentro y fuera del laboratorio.

Agradezco a mis profesores, compañeros y personal de la UNAM, en especial al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y asimismo a los centros e institutos donde tuve la oportunidad de desarrollar mis estudios de Doctorado. A todos ellos gracias por ser la parte estructural e indispensable de la formación de los recursos humanos de calidad que demanda el país y la humanidad.

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada (No. de becario 58472) para realizar mis estudios de Doctorado y desarrollar mi tesis. Gracias por confiar en la juventud de este país y por el apoyo a través de todos sus programas para la formación de la misma, ya que sin su apoyo yo no hubiera podido alcanzar mi meta.

Gracias a la UNAM, a todas sus cedes e institutos, por su valioso capital humano siempre abierto a la nación y al mundo, por su belleza arquitectónica y la armonía de su Ciudad Universitaria, que siempre permitió la convivencia y la coexistencia de distintas formas del pensamiento y de las culturas de México y extranjeras y por su continuo ofrecimiento de los más altos valores espirituales, tecnológicos, científicos e intelectuales que otorgan a nuestra *alma mater* el significado puro de Universidad.

Gracias a mis hermanos y mis padres, por ser mi más claro ejemplo de superación y por su amor y amistad que siempre me han ofrecido y que demuestran que son el núcleo más importante de nuestra nación: la familia. Por supuesto le doy gracias a la familia de cuñadas, suegros, tías, tíos, primos, con cuñados y tantas otras personas maravillosas que pertenecen a "mi gran familia".

A mi esposa Liliana y a mi hijo Luis Omar, los tesoros más grandes de mi vida, ejemplos de amor, compromiso, entrega y belleza humana. Gracias, por permitirme estar para ustedes y ser parte de su vida, y por esa maravillosa forma de lograr que me encuentre y me conozca a mi mismo y por compartir conmigo la fortuna más grande de un ser humano, vivir....

por ello, este trabajo se los dedico a mi esposa y a mi hijo.

Índice	Página
Resumen	1
Abstract	2
Introducción.....	3
Historia de la tuberculosis.....	4
Inmunopatogenia de la tuberculosis	6
Formación del granuloma	8
Respuesta inmune protectora en la tuberculosis	10
Papel de los macrófagos en la tuberculosis.....	12
Activación del macrófago.....	13
Planteamiento del problema.....	15
Hipótesis	16
Objetivos	16
Material y métodos	
Grupos de estudio	17
Obtención de macrófagos.....	18
Activación de macrófagos.....	19
Bacteria.....	19
Medición de la actividad microbicida en los macrófagos	20
Cuantificación de citocinas y óxido nítrico	21
Preparación de extractos nucleares y citoplásmicos	21
Western Blot y Retardo de la Movilidad Electroforética (EMSA).....	22
Análisis estadístico	22
Resultados	23
Discusión.....	31
Referencias	39
Publicación	50

Resumen.

La respuesta del macrófago al Interferón gamma (IFN- γ) es necesaria en el control de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. A pesar de estar deficiente la producción de IFN- γ a nivel sistémico, este se localiza en los sitios de infección de *M. tuberculosis* en sujetos con TB en niveles similares a los de sus convivientes infectados sanos (CCS). Lo que sugiere que la deficiencia en el control de la infección y la progresión a tuberculosis activa (TB), es debida a la deficiencia en la respuesta de los macrófagos al IFN- γ más que a la deficiencia en la producción de esta citocina. En el presente trabajo se evaluó la respuesta al IFN- γ de macrófagos de sujetos con TB, sujetos CCS y sujetos sanos no infectados (SNI). Los macrófagos de sujetos sanos (CCS y SNI), controlaron el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv y produjeron óxido nítrico e IL-12p70, mientras que los macrófagos del grupo TB no controlaron el crecimiento y produjeron más TNF- α e IL-10. El TGF- β se produjo en niveles similares entre los grupos de estudio. La infección por *M. tuberculosis* no modificó las respuestas al IFN- γ , pero por si sola fue capaz de inducir mayor IL-10 y TGF- β en los macrófagos de sujetos con TB. Aunque la transducción de señales del IFN- γ dependiente de Stat1 es completa y funcional, la fosforilación de Stat1 y c-Jun fue disminuida drásticamente en los macrófagos del grupo TB. Estos resultados muestran que la alteración de la señalización de IFN- γ en los macrófagos de sujetos con TB activa, sugieren que una regulación diferente afecta la funcionalidad del macrófago y posiblemente el progreso de la Tuberculosis.

Abstract

Macrophage response to Interferon-gamma (IFN- γ) is necessary for *Mycobacterium tuberculosis* infection control. IFN- γ is present in sites of *M. tuberculosis* infection in infected healthy individuals as well as in patients with active tuberculosis, suggesting a deficiency in the response of their macrophages to IFN- γ . It was analyzed the response to IFN- γ in macrophages of patients with active tuberculosis (TB), their healthy household contacts (CCS), and healthy uninfected controls from the community (SNI). Macrophages of healthy individuals (CCS and SNI) restrained *M. tuberculosis* H37Rv growth and mainly produced nitric oxide and IL-12p70 in response to IFN- γ , whereas TB macrophages did not controlled growth while produced higher levels of TNF α and IL-10. The IFN- γ -induced TGF- β levels were similar among all 3 groups. *M. tuberculosis* infection had little effect on the cytokine response to IFN- γ in macrophages of all groups but infection alone induced more IL-10 and TGF- β in TB macrophages. Although the IFN- γ signaling pathway through Stat1 was functional in TB macrophages, its activation along with c-Jun (AP-1) was diminished as compared to macrophages of healthy individuals. These results show the impairment of IFN- γ signaling in macrophages of people with active tuberculosis, suggesting a different molecular regulation that impact in macrophage functionality and probably disease outcome.

Introducción.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad que ha afectado a la humanidad durante miles de años (Salo *et al.*, 1994, Zink *et al.*, 2003, Donoghue *et al.*, 2004). En la época de Robert Koch, científico alemán que descubrió el agente causal *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) en 1882, una de cada siete personas moría por TB (Koch, 1982). En el siglo siguiente se observó un descenso prominente debido a la mejoría y precisión en el diagnóstico con la confirmación de lesiones pulmonares por rayos X, además del desarrollo de farmacoterapia, los programas de vacunación mundiales, mejoría en los factores socioeconómicos y posiblemente a la adquisición gradual de resistencia a la infección por la población (Taylor *et al.*, 2003, Harries & Dye, 2006, Lipsitch & Sousa, 2002). Sin embargo, a finales del mismo siglo (XX) se observó un resurgimiento de la enfermedad con proporciones pandémicas (Dye *et al.*, 1999), debido a la aparición del VIH causante del SIDA, la explosión demográfica, el incremento masivo de personas en pobreza extrema y el surgimiento de cepas resistentes a los fármacos, entre otras causas (Corbett *et al.*, 2003, Maartens & Wilkinson, 2007).

En la actualidad, la TB es un problema de salud pública a nivel mundial. Se estima que la tercera parte de la población humana mundial está infectada con la micobacteria (Dye *et al.*, 1999). Esto es debido a la fácil transmisión de la bacteria por vía aérea y a la alta tasa de infección (Raviglione, 2003). Los pacientes con TB activa que expectoran bacterias (bacilíferos), son la principal fuente de infección (Harries & Dye, 2006). De los enfermos registrados mundialmente por año, poco más del 44% fueron positivos al examen microscópico de expectoraciones (baciloscopías) (WHO, 2007). Cada persona enferma y no tratada puede infectar a 10 o 15 personas por año, incluyendo a sus familiares (Dye, 2006). Las estadísticas del año 2007, mostraban un panorama de disminución en la incidencia mundial de TB, sin embargo, en ese mismo año los enfermos sumaron más de 8 millones y las muertes más de 2 millones (26% de todas las muertes causadas por enfermedades prevenibles por vacunación) (WHO, 2007).

Estudios sobre antecedentes de infección por *M. tuberculosis* en poblaciones conocidas con individuos con y sin TB, muestran que en general del 5% al 10% de los individuos infectados pueden desarrollar la enfermedad activa en alguna etapa de su vida (Bloom *et al.*, 1992). Este número es significativamente mayor cuando la infección ocurre en grupos de personas sin historia previa de TB, además de que la mayoría de los individuos expuestos a la micobacteria son infectados de forma persistente, lo que demuestra la extrema susceptibilidad de la especie humana a *M. tuberculosis* (Kaufmann, 2001, Sousa *et al.*, 1997). Por estas razones se hace necesaria la búsqueda de información que identifique factores de riesgo, de control y de prevención de ésta enfermedad con el fin de evitar su propagación y mejorar las condiciones de salud de quienes la padecen.

Historia de la tuberculosis.

La TB es una enfermedad bien conocida desde la antigüedad. Las primeras referencias se encuentran en escritos del Antiguo Egipto, Babilonia y China (Wilson, 1996). Los hallazgos de ADN de *M. tuberculosis* en momias egipcias, indican que la enfermedad está presente desde hace más de 5,000 años (Zink *et al.*, 2003). Estudios sobre variabilidad genética indican que la micobacteria es uno de los patógenos más antiguos del ser humano ya que su ancestro proviene de hace más de 3 millones de años (Donoghue *et al.*, 2004). Aunque la tuberculosis en el nuevo mundo no es tan antigua, al parecer en un inicio llegó a América del Sur antes de la importación de TB por los españoles. Estudios en momias peruanas y colombianas procedentes de la época precolombina revelaron la presencia de ADN de *M. tuberculosis* (Sotomayor *et al.*, 2004, Salo *et al.*, 1994).

A pesar de que la TB ya era común desde la antigüedad, es hasta el siglo XVIII en la Revolución Industrial donde cobra importancia. La TB era la enfermedad líder por causar la mayor mortalidad en el mundo, principalmente de obreros y sus familiares (Harries & Dye, 2006). Fue hasta principios del Siglo XIX que se realizaron los primeros estudios detallados postmortem y se estableció la naturaleza infecciosa de la enfermedad, aunque sin llegar a demostrar el agente

causal (Bloom, 1994). Los esfuerzos llevaron a Robert Koch en 1882, a establecer que una bacteria con propiedades de tinción muy especiales era la causa infecciosa de la enfermedad, por lo que se le conoce a esta micobacteria como el bacilo de Koch (Koch, 1982). Posteriormente, con la fácil identificación del bacilo en el esputo debido a la mejoría en la tinción realizada por Ziehl y Neelsen, junto con el descubrimiento de los rayos X por Conrad Roentgen en 1895, se obtuvo una mejoría y precisión en el diagnóstico de TB. Contrariamente a los avances en el diagnóstico, el tratamiento seguía en obvio fracaso debido a que se basaba solo en reposo y administración de aire fresco y baños de sol. Koch continuó en la búsqueda de una cura para la TB y a principios del siglo XX comenzó con la administración del PPD (derivado proteico purificado) como tratamiento, llamado tuberculina. A pesar de que no se obtuvo una mejoría en la salud de los pacientes tratados con PPD, este permanece como una de las herramientas de diagnóstico de la infección a nivel poblacional (Bloom, 1994). En 1921, Albert Calmette y Camille Guérin, el primero Médico Cirujano y el segundo Médico Veterinario, desarrollaron una vacuna a partir del bacilo causante de la tuberculosis en las vacas (*Mycobacterium bovis*) que atenuaron a través de subcultivos en medio con bilis de buey, conocido como Bacilo Calmette-Guérin (vacuna BCG). Debido al éxito demostrado en abatir notoriamente los casos de tuberculosis en toda Europa, la vacuna BCG se distribuyó a diversos sitios de todo el mundo. Posteriormente con la introducción de la liofilización en 1939, a finales de la década de 1940 se pudieron implementar campañas de vacunación masivas y planes preventivos mundiales recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS). El descubrimiento de los fármacos antituberculosos, estreptomina en 1943 e isoniazida en 1952 y la introducción de rifampicina en 1965, generaron el tratamiento combinado (no menor a seis meses) que fortaleció el combate a la enfermedad. Finalmente entre 1970 y 1980, los programas de búsqueda masiva de casos y de institución de tratamiento en el mundo desarrollado, junto con la introducción del control de la TB en los servicios generales de salud del mundo subdesarrollado, se disminuyó la TB a nivel mundial, por lo que el sentimiento general fue que se había conquistado y el interés en la enfermedad declinó. Sin

embargo, a partir de la década de 1980 como consecuencia al abandono en el control de la tuberculosis, al surgimiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), a los conflictos bélicos en África Subsahariana y otros sitios del mundo, a la caída de las principales potencias como la disolución de la Unión Soviética, al deterioro económico de muchos países que arrojaron a millones de personas a la pobreza extrema, a condiciones de hacinamiento y mala higiene, se favorecieron la diseminación de la infección y la progresión a la enfermedad en aquellos infectados. En 1990 sucedió un repunte en la incidencia de casos y de muertes por TB. Por lo que en 1993 la OMS declaró a la enfermedad como emergencia global (WHO, 2007). Desde entonces se han enfocado los esfuerzos en la búsqueda de nuevas vacunas y fármacos y en dilucidar los mecanismos por los que la bacteria causa la infección y por los que esta progresa a la enfermedad, que si bien puede llegar a ser mortal su mayor impacto radica en el estado de salud y productividad de los que la padecen.

Inmunopatogenia de la tuberculosis.

M. tuberculosis posee mecanismos que le permiten infectar, sobrevivir, multiplicarse y establecer un tipo de infección persistente en un individuo y causar la enfermedad (Smith, 2003). *M. tuberculosis* tiene la capacidad de sobrevivir a las condiciones adversas que encuentra durante el proceso infeccioso. Es capaz de sobrevivir al estrés bactericida del macrófago, al ambiente anaeróbico y nutricional alterado del granuloma y de inactivarse metabólicamente en estado de latencia (Mehrotra *et al.*, 2001).

La transmisión comienza con la expectoración de *M. tuberculosis* por pacientes bacilíferos con TB activa en gotas microscópicas o aerosoles (menores de 5 μm de diámetro) que son diseminadas al toser, estornudar, escupir o hablar. Las bacterias viajan por el aire y pueden permanecer por horas suspendidas en las microgotas cuando las condiciones de humedad y temperatura ambientales son favorables. Las bacterias son inhaladas y pueden ser atrapadas por los vellos y moco nasales o en el sistema mucociliar de la traquea y ser desechadas por el

estornudo, las flemas o ser deglutidas. Las bacterias infectivas son las que por inhalación llegan hasta los alvéolos donde la bacteria es fagocitada por los macrófagos alveolares, se multiplica y se disemina a los ganglios linfáticos y otras partes del cuerpo (Beggs *et al.*, 2003, Kaufmann, 2005, Bhatt *et al.*, 2007). En las primeras seis semanas a partir de la infección primaria, el organismo genera una respuesta inmune que, en la mayoría de los casos, detiene la multiplicación del bacilo y la única evidencia de infección es un resultado positivo al examen de tuberculina o prueba intradérmica de Mantoux (PPD+) (Harries *et al.*, 2006). El riesgo de desarrollar TB después de la infección primaria cambia con la edad. El mayor riesgo es entre los primeros 5 años después de la infección. Los niños desde el nacimiento hasta la edad de 5 años tienen un riesgo relativamente mayor de desarrollar las formas severas de la enfermedad (TB miliar y meningitis tuberculosa), debido a sus sistemas inmunes inmaduros, sin embargo no son transmisores del bacilo. Los niños mayores de 5 años y hasta los 15 años son relativamente resistentes a la TB. El riesgo comienza nuevamente en la adolescencia, permanece aproximadamente estable durante la adultez pero incrementa nuevamente en las etapas mayores (Harries *et al.*, 2006). Otros factores que incrementan el riesgo de padecer TB después de la infección inicial incluyen la desnutrición, el alcoholismo, fármacos inmunosupresores, tabaquismo, contaminación atmosférica y enfermedades como diabetes tipo 2 (Bloom, 1994). Sin embargo, ninguno de esos factores es tan importante como la infección con el VIH (Harries *et al.*, 2006).

Los macrófagos alveolares desempeñan un papel esencial en la eliminación de patógenos que entran al organismo por vía aérea y son considerados la primera población celular del sistema inmune que interactúa con el patógeno (Kaufmann, 2001). La interacción inicial de *M. tuberculosis* con el macrófago tiene lugar a través de receptores fagocíticos y de receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRR-PAMPs) (Ernst, 1998, Taylor *et al.*, 2005). Esta interacción resulta en la liberación de citocinas y quimiocinas inflamatorias por parte del macrófago, que reclutan a las células del sistema

inmune como neutrófilos, células dendríticas (DC), monocitos circulantes, células NK (natural killer), linfocitos T CD4+ y CD8+ y macrófagos al sitio de infección (Kaufmann SH, 2001; Bhatt K, 2007). Sin embargo, resultados de experimentos *in vitro* sugieren que la respuesta predominante del macrófago depende del tipo de receptor con el cual la micobacteria interactúa con el resultado de la liberación de citocinas anti-inflamatorias (Brightbill *et al.*, 1999, Schlesinger, 1993). Simultáneamente, la micobacteria es fagocitada y en contraste a la fagocitosis normal, en la que el contenido del fagosoma es degradado a través de la fusión con el lisosoma, *M. tuberculosis* bloquea este proceso al arrestar al fagosoma en un estado inmaduro y como consecuencia persiste dentro del macrófago; además de disminuir la presentación de antígenos (Armstrong *et al.*, 1971, Vergne *et al.*, 2005, McDonough *et al.*, 1993). Los macrófagos son eliminados por la micobacteria a través de la inducción de los mecanismos de muerte celular apoptosis y necrosis (Bocchino *et al.*, 2005, Placido *et al.*, 1997, Gil *et al.*, 2004). Otras consecuencias negativas de la infección por *M. tuberculosis* en el macrófago es que induce una disminución de la señalización por receptores de reconocimiento para la respuesta inmune innata (Pathak *et al.*, 2007) y afecta la capacidad de respuesta al interferón gamma (IFN- γ) (Ting *et al.*, 1999, Kincaid *et al.*, 2003, Pai *et al.*, 2004, Banaiee *et al.*, 2006a). Todo este proceso inicial se repite continuamente ante la incapacidad del sistema inmune innato en eliminar a la micobacteria, lo que induce la remodelación del sitio de infección y la formación de la lesión inflamatoria llamada granuloma, característica de la tuberculosis (Russell, 2007).

Formación del granuloma.

Los macrófagos infectados y no infectados comienzan a agregarse en el intersticio del pulmón para formar un granuloma naciente (Co *et al.*, 2004). Alrededor de la cuarta semana la inmunidad mediada por células comienza a realizar el control de la infección y la carga bacteriana disminuye notablemente y es mantenida a niveles muy bajos. Durante este tiempo la micobacteria entra en un estado de baja actividad conocida como estado no replicativo de persistencia (Wayne *et al.*,

2001). Bajo la influencia de los linfocitos T CD4+, las lesiones granulomatosas comienzan a engrandecerse por el reclutamiento de otras células incluyendo linfocitos, macrófagos y fibroblastos (Birkness *et al.*, 2007). Los macrófagos reclutados son dirigidos hacia el centro de la lesión en donde por la activación a través del IFN- γ se diferencian a células epitelioides y se fusionan para formar células gigantes multinucleadas. En la periferia en estrecho contacto con los macrófagos se localizan los linfocitos T CD4+ y CD8+. Los fibroblastos rodean la lesión y secretan un escudo de matriz extracelular, la cual provee de una barrera física que evita la diseminación de la bacteria (Russell, 2007, Co *et al.*, 2004). Los macrófagos muertos por apoptosis (cuerpos apoptóticos) son fagocitados silenciosamente por otros macrófagos, mientras que los macrófagos muertos por necrosis desencadenan mayor inflamación y necrosis y los detritos se acumulan en el tejido (Bocchino *et al.*, 2005, Saunders *et al.*, 2007). En la tuberculosis en el humano, la mayoría de los granulomas tienen el centro sin células con material necrótico que pueden formar cavitaciones que macroscópicamente es parecido al queso (necrosis caseosa), lo que se observa incluso en granulomas recién formados (Lin *et al.*, 2006). El tejido es remodelado con células nuevas o es sustituido por tejido de cicatrización y fibrosis con deposición de minerales como el calcio (Segovia-Juarez *et al.*, 2004). Con el tiempo estos granulomas se calcifican; lo que es visible en el diagnóstico por rayos X (Russell, 2007, Ulrichs *et al.*, 2006). Algunas bacterias escapan de los granulomas y perpetúan la infección con la neoformación de granulomas (reactivación) (Co *et al.*, 2004).

Los granulomas previenen la diseminación de la micobacteria. No obstante que *M. tuberculosis* persiste en el hospedero, solamente un pequeño porcentaje de los individuos infectados desarrolla la enfermedad, mientras que la mayoría (90%) ni manifiestan signos clínicos, desarrollan lesiones progresivas, o expectoran bacilos, por lo que se considera están en un estado latente de infección (Bloom, 1994, Kaufmann, 2001). La manifestación de signos y síntomas están relacionados con la formación deficiente de granulomas (Ulrichs *et al.*, 2005). La bacteremia y la liberación de citocinas asociadas a ésta inducen fiebre, que es intermitente debido

a los espacios de tiempo en que la micobacteria entra al torrente sanguíneo antes de ser detectada por el sistema inmune en el bazo (Bloom, 1994). La presencia del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) en la sangre induce la aceleración del catabolismo que conlleva a la pérdida de peso o caquexia y a la debilidad general (Harries *et al.*, 2006). La tos es ocasionada en respuesta a la inflamación y las lesiones en el tejido pulmonar (Fauci *et al.*, 2008). Este cuadro clínico está fuertemente asociado con la infección por *M. tuberculosis* en comparación con otras micobacterias que infectan el pulmón del humano (Shitrit *et al.*, 2007, de Jong *et al.*, 2007, Emile *et al.*, 1997). Frecuentemente, el grado de diseminación bacteriana correlaciona más con el cuadro clínico, que el número de micobacterias presentes en las lesiones (Ulrichs *et al.*, 2006). Adicionalmente, el centro de necrosis caseosa contiene micobacterias que pueden ser diseminadas por la sangre o por expectoraciones a otros órganos o individuos y perpetuar el ciclo (Russell, 2007).

Respuesta inmune protectora en la tuberculosis.

En un individuo susceptible la infección comienza con la inhalación de los bacilos expectorados por una persona enferma, como se describió anteriormente. Sin embargo, no todos los individuos expuestos a la bacteria desarrollan una infección, un pequeño porcentaje eliminará a la micobacteria (Kaufmann, 2001). En estos individuos se postula que su sistema inmune innato es lo suficientemente eficaz en eliminar a la micobacteria antes de iniciar una infección (Bhatt *et al.*, 2007). No obstante, la gran mayoría de los individuos expuestos terminan siendo infectados con la bacteria, lo cual afirma que el sistema inmune innato por sí solo es incapaz de llevar a cabo una eliminación del patógeno en el hospedero (Sousa *et al.*, 1997). Por el contrario, el sistema inmune adquirido parece controlar la infección en forma latente para la mayoría de los individuos. Los macrófagos, linfocitos T, células NK y DC, tienen una función determinante en el control de la infección a través de la interleucina-12 (IL-12), el TNF- α , el interferón gamma (IFN- γ), la IL-10 y el Factor Transformante de Crecimiento beta (TGF- β) (Flynn *et al.*, 2001, Kaufmann *et al.*, 2005).

Las DC fagocitan a los antígenos secretados por la micobacteria o los procesados por los macrófagos, además de fagocitar micobacterias en el sitio de infección. A diferencia de los macrófagos, las DC migran hacia los ganglios linfáticos mediastínicos que drenan localmente en el pulmón a través de los vasos linfáticos aferentes. En los ganglios linfáticos las DC presentan los antígenos a través del MHC tipo II a los linfocitos vírgenes para iniciar la respuesta inmune celular (Marino *et al.*, 2004a, Randolph *et al.*, 2005, Marino *et al.*, 2004b, Mellman *et al.*, 2001). El éxito en el establecimiento de la respuesta inmune protectora por las DC radica en su estado de diferenciación y maduración (Reis e, 2004, Shortman *et al.*, 2002). Los estudios sobre la diferenciación y maduración de las DC inducidas por *M. tuberculosis* y sus antígenos, revelan que inicialmente existe una maduración de DC y posterior inducción de linfocitos T cooperadores tipo 1 (TH1) productores de IFN- γ pero que asimismo se realiza una modulación negativa a través de la producción de IL-10 y TGF- β por las DC, lo que induce la inactivación de los linfocitos T efectores (Latchumanan *et al.*, 2005, Giacomini *et al.*, 2001, Wolf *et al.*, 2007). Por otro lado, aunque *M. tuberculosis* se duplica en las DC limitadamente, estas transportan a la micobacteria hacia los ganglios linfáticos (Wolf *et al.*, 2008) o hacia otros órganos, por lo que se considera un mecanismo de diseminación (Humphreys *et al.*, 2006, Tailleux *et al.*, 2003). Sin embargo, la migración linfática de las DC infectadas es transitoria y la mayoría de estas permanece en el sitio de infección, por lo que la presentación de antígenos por estas es reducida siendo ineficaces en montar una respuesta protectora TH1 (Wolf *et al.*, 2007, Giacomini *et al.*, 2001). No obstante, en las estructuras foliculares que se forman adyacentes a los granulomas de individuos sanos (latencia), las DC participan exitosamente en la presentación de antígenos y la inducción de la respuesta TH1, lo que revela que estas estructuras tienen funciones similares a las que se ubican en los ganglios linfáticos (Ulrichs *et al.*, 2006, Ulrichs *et al.*, 2004).

Los linfocitos T migran de los ganglios linfáticos al sitio de infección después de reconocer los antígenos específicos que presentaron las células dendríticas. La respuesta inmune protectora contra *M. tuberculosis*, requiere la inducción de la inmunidad mediada por linfocitos TH1 (Kaufmann, 2001). La respuesta inmune protectora contra *M. tuberculosis*, se ha descrito para los individuos infectados que están sanos y que conviven con pacientes con tuberculosis (TB) activa. La respuesta inmune en estos individuos se caracteriza por la producción de IFN- γ por linfocitos T CD4+, la activación de macrófagos y la participación de linfocitos T CD8+ (Schwander *et al.*, 2000, Carranza *et al.*, 2006, MacMicking *et al.*, 1997). La IL-12 activa linfocitos TH1 para producir IFN- γ (Bogdan C, 2000). La producción de IFN- γ por los linfocitos, depende entonces de la presentación y reconocimiento de los antígenos y de la estimulación con IL-12, factores determinantes en el control de la infección (Flynn *et al.*, 1993).

Papel de los macrófagos en la tuberculosis.

Los macrófagos participan en la infección por *M. tuberculosis* desde el inicio de la misma. Estas células residen en los alvéolos de forma inactiva o en reposo. El inicio de su actividad fagocítica y de presentación de antígenos se conoce como estado de iniciación (“priming” en Inglés), que con estímulos subsecuentes esta actividad se incrementa hasta alcanzar la activación (“fully activation” en Inglés) (Mosser, 2003). En este estado la célula ha alcanzado su máximo potencial de lisis (Ma *et al.*, 2003). La activación del macrófago se obtiene con el IFN- γ o el LPS (Ma *et al.*, 2003, Nathan *et al.*, 1984). En la tuberculosis la activación del macrófago por el IFN- γ es esencial, ya que esto determina la contención de la infección (Kaufmann, 2002, Flynn *et al.*, 1993, Boehm *et al.*, 1997, Kawatsu *et al.*, 1991).

Activación del macrófago.

La activación del macrófago por el IFN- γ o el LPS se conoce como “activación clásica”. Inicialmente la activación de macrófagos de humano, con IFN- γ recombinante, se reconoció por la inducción de grandes cantidades de reactivos

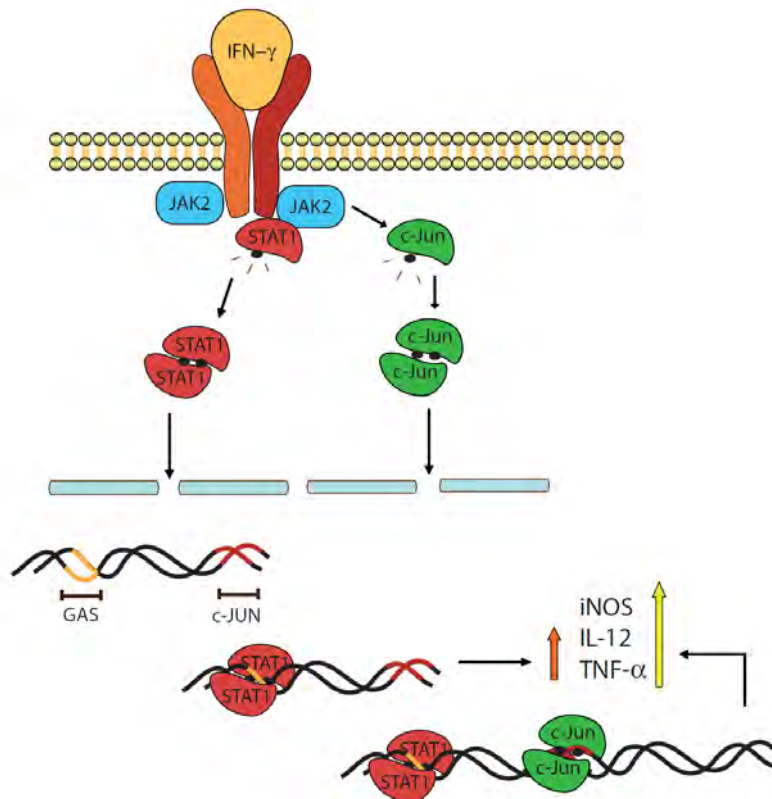
del oxígeno y de citocinas y por su capacidad de eliminar patógenos intracelulares (Nathan et al., 1984). Actualmente, la “activación clásica” del macrófago se describe como el incremento de la actividad fagocítica, bactericida y pro-inflamatoria (Gordon, 2003, Goerdet *et al.*, 1999). En condiciones normales el IFN- γ induce en el macrófago la producción de radicales reactivos del oxígeno y del nitrógeno como el óxido nítrico (ON), radicales con propiedades microbicidas (permite la eliminación de bacterias, hongos, parásitos y virus, además de células tumorales) e induce la producción de citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α , que participa en la formación y en el mantenimiento de la integridad estructural del granuloma (Ulrichs *et al.*, 2006, Mohan *et al.*, 2001), y la IL-12 que promueve la diferenciación de linfocitos T CD4+ en linfocitos TH1 (Mohan et al., 2001), además de incrementar la presentación de antígenos (Nathan *et al.*, 1991, Chan *et al.*, 1992, Akaike *et al.*, 2000, Hickman-Davis *et al.*, 2001, Mosser, 2003, Collins, 2003). El IFN- γ también estimula la síntesis de IL-10 y TGF- β en el macrófago, citocinas con efecto anti-inflamatorio (de la Barrera *et al.*, 2004, Boehm *et al.*, 1997) y que regulan la respuesta inflamatoria del macrófago inducida por el IFN- γ (de la Barrera *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2006).

La activación del macrófago con IFN- γ , previa a la infección con *M. tuberculosis*, le permite a esta célula evitar el bloqueo en la maduración del fagosoma y favorece la lisis de la micobacteria por la producción del óxido nítrico y radicales del oxígeno, a través de la acidificación de los fagosomas por la actividad de la bomba de protones vacuolar (H⁺ vATPasa) (Bonecini-Almeida *et al.*, 1998, MacMicking *et al.*, 1997, Belosevic *et al.*, 1988).

La unión del IFN- γ a su receptor induce la trans-fosforilación de las Janus cinasas (Jak)-1 y Jak-2 asociadas a este. Las Jaks activadas fosforilan el dominio intracelular del receptor de IFN- γ (IFNGR), el cual sirve de sitio de anclaje para la Stat1. La Stat1 es fosforilada por Jak2 en la tirosina 701 (Tyr 701) y forma un homodímero que se transporta al núcleo y regula la expresión de genes por la unión con su secuencia consenso de ADN, denominada GAS (gamma interferon-

activated sequence), en las regiones promotoras de genes regulados por IFN- γ (Figura Activación). En respuesta al IFN- γ , el IFNGR activa otras cinasas de forma Stat1 independiente, incluyendo a las MAP cinasas (protein-cinasas activadas por mitógenos) como JNK (cinasa c-Jun N-terminal), PI3K (fosfatidil inositol 3 cinasa)-AKT, Pyk2 y las ERK1/2 (cinasa regulada por señales extracelulares 1/2) (Hu *et al.*, 2002, Ramana *et al.*, 2002). Estas cinasas, que también están integradas en cascadas de señales de los TLR, tienen importantes consecuencias fisiológicas durante la infección por *M. tuberculosis* (Yang *et al.*, 2007).

FIGURA ACTIVACION



Planteamiento del problema.

Los estudios en pacientes con TB activa sugerían que la infección progresa a enfermedad debido a que los linfocitos T antígeno-específicos productores de IFN- γ circulantes en sangre están disminuidos (Torres *et al.*, 1998) (Torres M, 1998; Hussain R, 2002; Morosini M, 2005), debido a que se acumulan en las áreas de infección (Veenstra H, 2006; Barnes PF, 1993). Sin embargo, aunque la producción de IFN- γ varía entre individuos, hay estudios que describen que tanto el IFN- γ como la IL-12 y el TNF- α se producen en los pacientes con TB activa en el sitio de la infección con niveles incluso mayores a los de los individuos sanos con infección (Fenhalls *et al.*, 2000, Lin *et al.*, 1996, Mehra *et al.*, 1996, Kawatsu *et al.*, 1991).

Por otro lado, los resultados de experimentos *ex vivo* con macrófagos alveolares de pacientes con TB muestran que su respuesta micobactericida al IFN- γ se encuentra disminuida al compararla con los macrófagos de sujetos sanos (Kawatsu *et al.*, 1991). Esta observación no es debida a diferencias en el número y funcionalidad del receptor de IFN- γ (IFNGR), ya que el número de IFNGR en los monocitos de individuos con tuberculosis activa es similar al de individuos sanos PPD+ (Fraser *et al.*, 2003) y el polimorfismo o mutación en el gen del IFNGR no está asociado a la tuberculosis (Fraser *et al.*, 2003, Awomoyi *et al.*, 2004). Además de que las alteraciones genéticas del IFN- γ y de los componentes de su cascada de señalización son muy raras en la población (Mansouri *et al.*, 2005, Dupuis *et al.*, 2001). Hasta ahora, las evidencias sugieren que la capacidad de los macrófagos de responder al IFN- γ está mas asociada con el desarrollo de tuberculosis que la cantidad producida de ésta citocina.

Los antecedentes señalan que la infección por *M. tuberculosis* progresa a la enfermedad activa en muy pocos individuos a pesar de la respuesta TH1 y sugieren mas bien una alteración de la respuesta del macrófago hacia el IFN- γ , más que una falta en la producción o funcionamiento de esta citocina. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue estudiar la actividad bactericida contra

Mycobacterium tuberculosis y el perfil de citocinas inducidos por el IFN- γ en macrófagos de pacientes con TB activa, sus convivientes cercanos sanos y en individuos sanos no infectados de la misma comunidad.

Hipótesis.

La cascada de señales del IFN- γ en macrófagos de pacientes con tuberculosis activa está alterada.

Objetivo General.

Estudiar la respuesta al IFN- γ en macrófagos de sujetos con tuberculosis pulmonar activa, sus convivientes cercanos sanos PPD+ y personas sanas PPD- no relacionadas.

Objetivos específicos.

1. Comparar el crecimiento de *M. tuberculosis* en macrófagos estimulados con IFN- γ en sujetos con tuberculosis pulmonar activa, sus convivientes cercanos sanos PPD+ y personas sanas PPD-.
2. Cuantificar la producción de óxido nítrico, IL-12, TNF- α , IL-10 y TGF- β en macrófagos estimulados con IFN- γ en sujetos con tuberculosis pulmonar activa, sus convivientes cercanos sanos PPD+ y personas sanas PPD-.
3. Confirmar la activación, transporte al núcleo y unión a la región de ADN complementaria de Stat1 en macrófagos estimulados con IFN- γ e infectados con *M. tuberculosis* provenientes de sujetos con tuberculosis pulmonar activa, sus convivientes cercanos sanos PPD+ y personas sanas PPD-.

Material y métodos.

Tipo de Estudio.

Experimental, descriptivo, transversal.

Grupos de estudio.

(i) Personas con tuberculosis pulmonar activa; Grupo TB. Las muestras sanguíneas de 14 pacientes con TB pulmonar activa se obtuvieron después del consentimiento informado. Los pacientes se presentaron al servicio de Microbiología Clínica del INER con síntomas de tuberculosis pulmonar en donde se confirmó el diagnóstico por baciloscopia y cultivo. La muestra sanguínea se obtuvo previamente al tratamiento anti-tuberculoso. Los pacientes incluidos fueron aquellos sin antecedente de tuberculosis (primera vez) con reacción positiva (>10 mm de induración) a 5 unidades de derivado proteico purificado (PPD) de *M. tuberculosis* por la prueba de Mantoux, a las 72 horas de aplicación intradérmica.

(ii) Donadores sanos infectados con *M. tuberculosis*; Grupo CCS. Las muestras sanguíneas se obtuvieron previo consentimiento bajo información, de 15 personas sin síntomas ni antecedentes de tuberculosis, convivientes cercanos de los pacientes con TB activa, por un periodo de al menos 5 meses y con reacción positiva al PPD. Todos los convivientes fueron negativos a la inspección baciloscópica por tres ocasiones y al cultivo.

(iii) Personas sanas no infectadas por *M. tuberculosis*; Grupo SIN. Las muestras sanguíneas de 14 individuos sin síntomas de tuberculosis, ni historia de exposición conocida a pacientes con tuberculosis, se obtuvieron después de su consentimiento informado. Todos los individuos reclutados tuvieron una prueba negativa al PPD (<5 mm) por doble exposición con intervalo de 1 mes.

Otros criterios de inclusión aplicados a los tres grupos fueron: edad de 18 hasta 54 años, ausencia de infección por VIH y ausencia de alguna enfermedad crónica e

inmunosupresora (hipertensión vascular, diabetes, hepatitis, asma) o medicación con corticosteroides. El protocolo de investigación fue aprobado por los comités de Ciencia y Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Obtención de macrófagos.

Una muestra de 80 mL de sangre se obtuvo de forma aséptica de los voluntarios después de firmar su consentimiento informado. La sangre se diluyó 1:1 con PBS, pH 7.4, se depositó sobre Ficol-Paque (proporción 2:1) y se centrifugó 30 min a 850 g a temperatura ambiente (TA). La interfase blanca se obtuvo y se eliminaron las plaquetas mediante lavados con 10% de plasma autólogo en PBS a 350 g a TA por 5 min cada uno. Los leucocitos se resuspendieron en medio RPMI (RPMI 1640 pH 7.4, con L-glutamina 2 mM, glucosa 0.45%, Hepes 10 mM, NaHCO₃ 1.5 mM y Piruvato de Sodio 1 mM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y se sembraron en placas de cultivo de 100 x 20 mm de poliestireno (Nunclon). Después de tres horas de incubación a 37°C con 5% de CO₂, las células no adheridas se eliminaron mediante lavados con RPMI sin suero y los monocitos adheridos se incubaron por 7 días con RPMI suplementado con 10% de SFB, con recambios de medio a los días 2, 4 y 7. Las células obtenidas fueron más del 95% CD14 y CD11b positivas en la evaluación por citometría de flujo después del marcaje con anticuerpos fluorescentes (mouse anti-human CD14-PE y mouse anti-human CD11b-Alexa Fluor 488, Amersham Biosciences), las células contaminantes fueron en su mayoría (~3%) linfocitos (CD3+). Los monocitos obtenidos tanto de los pacientes de tuberculosis como de sus convivientes sanos, no estaban infectados previamente con *M. tuberculosis*, como lo evidenció el examen microscópico de las células por tinción de Ziehl-Neelsen y Auramina-Rodamina y por análisis genómico por PCR e hibridación en fase sólida del gen *esxB* (CFP10) de *M. tuberculosis* H37Rv en extractos de los monocitos. La cosecha de los macrófagos se realizó despegándolos gentilmente con un raspador después de la incubación por 10 min con EDTA 0.5 mM en PBS frío sobre hielo.

La viabilidad de las células fue superior al 98%, cuantificada por la exclusión del azul de tripano.

Activación de macrófagos.

Los macrófagos se incubaron con 500 U (20 ng) de IFN- γ recombinante de humano (PeproTech) por mililitro de medio RPMI con 10% de SFB, durante 22 h y luego se reemplazó el medio con medio fresco, después de dos lavados con medio tibio RPMI sin suero. Este tiempo y dosis fueron empleados por la eficacia de la citocina para alargar el tamaño de las células con elongación de pseudópodos membranales en más del 90% de la población celular, evidenciado por conteo en microscopía de luz y por inducir la producción de óxido nítrico medido a través del ensayo de Griess (Ding & Nathan, 1988, Ting *et al.*, 1999) en macrófagos derivados de monocitos obtenidos de concentrados leucocitarios de personas sanas donados por el Banco de Sangre del Instituto Nacional de Pediatría.

Bacteria.

La cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618) se creció en medio líquido Middlebrook 7H9 suplementado con 0.05% de Tween 80 y 10% de ADC (albúmina bovina, dextrosa y catalasa), a 37°C con agitación constante. El cultivo se cosechó en la fase de crecimiento exponencial por centrifugación a 1500 x g durante 20 min a TA. Las bacterias se lavaron en medio RPMI sin suero por tres ocasiones, se resuspendieron en medio RPMI con 10% de SFB y 15% de glicerol y se congelaron a -70°C. Las suspensiones bacterianas se descongelaron y se disgregaron los cúmulos con seis pulsos de ultrasonido de 20 seg en un baño de agua ultrasónico con intervalos de 60 seg. El número de unidades formadoras de colonia (UFC) se obtuvo a partir de la siembra y cultivo de diluciones seriadas en placas de agar Middlebrook 7H10 suplementado con 10% de OADC (ácido oléico y ADC) y 5% de glicerol. El cultivo y manipulación de la cepa tipo y las infecciones de los macrófagos se realizaron en la Unidad de Bioseguridad Nivel II en contención primaria nivel III (cabina de flujo clase 2 B), del Departamento de

Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Medición de la actividad microbicida en los macrófagos.

El presente ensayo fue adaptado de un estudio previo realizado por Wong *et al.* (Wong *et al.*, 2007). Los bacilos dispersados por ultrasonido (ver arriba) fueron adicionados a cultivos por triplicado de 1×10^4 macrófagos adherentes y preestimulados con IFN- γ o sin el a una multiplicidad de infección de 10 UFC. Después de 4 horas de incubación, los cultivos de macrófagos fueron lavados tres veces con RPMI tibio sin suero para remover las bacterias no adheridas a los macrófagos o no fagocitadas. Este se consideró el tiempo cero (inicio de la infección). En los tiempos cero y 48 horas se lisaron los macrófagos con la micropipeta después de incubarlos con 0.1% de Tritón X-100 en PBS. Los lisados micobacterianos se diluyeron en forma seriada después de procesarlos por ultrasonido como se describió anteriormente y se sembraron en placas de agar Middlebrook 7H10 con 10% de OADC. Después de incubarlos por 21 días a 37°C, las UFC fueron contadas. Como control, un inóculo de micobacterias conteniendo la misma cantidad de UFC fue adicionado por duplicado a pozos sin células y cultivado bajo las mismas condiciones que los macrófagos infectados. El índice de crecimiento de la micobacteria en los macrófagos se definió como el número de UFC a las 48 h de cocultivo dividido entre el número de UFC a las 0 h: un índice de crecimiento mayor a 1 significa que la bacteria se multiplicó dentro del macrófago, mientras que un índice de crecimiento igual o menor de 1 significa que los macrófagos detuvieron su crecimiento o que gradualmente la mataron (Green LC, 1982). Con estos tiempos de infección (4 h) y de crecimiento (48 h), se observó que del 30 al 40% (95% de intervalo de confianza) de los macrófagos contenían al menos 1 bacilo, observado por conteo de 200 células en microscopía de epifluorescencia con la tinción de Auramina-Rodamina y que más del 95% de los macrófagos eran viables determinado por la exclusión del azul de tripano.

Cuantificación de citocinas y óxido nítrico.

Los sobrenadantes de cultivos por triplicado de 2×10^5 macrófagos adherentes en reposo o activados e infectados con *M. tuberculosis* por 4 horas, se obtuvieron a las 48 horas post-infección y se congelaron a -70°C hasta su uso. Se descongelaron los sobrenadantes, se estabilizaron a TA y se determinó por duplicado la concentración de IL-10, IL-12, TNF- α y TGF- β a partir de curvas patrón elaboradas con las citocinas recombinantes de humano por medio de ELISA directo siguiendo las instrucciones del fabricante (DuoSet enzyme-linked immunosorbent assay development system; R&D Systems, Inc). El óxido nítrico se cuantificó por triplicado a través de los niveles de acumulación de nitrato (NO_2), producto estable de la síntesis del óxido nítrico (Ding *et al.*, 1988), con el ensayo de Griess tomando como patrón una curva estándar de NaNO_2 (Ting *et al.*, 1999) y expresado en nanomolar por 1×10^6 macrófagos.

Preparación de extractos nucleares y citoplásmicos.

Las monocapas de macrófagos se incubaron durante 10 minutos con PBS frío, se liberaron en PBS con PMSF 1 mM y se centrifugaron ($500 \times g$) a 4°C por 10 minutos. Las células fueron resuspendidas en el amortiguador A (HEPES 20 mM, pH 7.9, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA de 1 mM, de Ortovanadato de sodio 1 mM, NaF 50 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 20 mg/ml, antipaina 20 mg/ml, leupeptina 20 mg/ml y pepstatina A 10 mg/ml) y se incubaron en hielo (a 4°C) por 10 minutos con Nonidet P-40, a una concentración final del 0.2%. Las células se rompieron al pasarlas por jeringa y aguja de 26 G. Después de centrifugar la suspensión celular ($12,000 \times g$) a 4°C durante 1 minuto, los sobrenadantes fueron colectados como extractos citoplásmicos, y los precipitados (núcleos crudos) fueron resuspendidos en el amortiguador B (HEPES 20 mM, pH 7.9, NaCl 0.4 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, Ortovanadato de sodio 1 mM, NaF 50 mM, y los mismos inhibidores de proteasas que en la solución amortiguadora A). Después de incubar durante 60 minutos en hielo, los materiales insolubles fueron precipitados por centrifugación ($15,000 \times g$) a 4°C durante 10 minutos y los sobrenadantes fueron coleccionados como extractos proteicos nucleares.

Western Blot y Retardo de la Movilidad Electroforética (EMSA).

Para determinar la activación y la calidad de la cascada de señales del IFN- γ , se analizaron los extractos nucleares y citoplásmicos de los macrófagos a través del ensayo tipo Western blot y EMSA. Las células tratadas con 500 U/ml de IFN- γ durante 45 minutos fueron tratadas para la extracción citoplásmica y nuclear como se describió anteriormente. Las muestras de 20 μ g de proteínas se separaron por SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras y se transfirieron a una membrana de PVDF. Las membranas o blots fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en TBS con Tween 20 al 0.1%. Las membranas fueron probadas con anticuerpos contra las formas fosforiladas de Stat1 (Tyr701) (Santa Cruz Biotechnologies; 1/200), AKT (Cell Signaling Technology; 1/1000), y c-Jun (Cell Signaling Technology; 1/1000). Los anticuerpos secundarios respectivos fueron anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Jackson; 1/10000) y anti-IgG de conejo conjugado con HRP (Zymed; el 1/5000) y se revelaron usando luminiscencia (Immobilon Western, Millipore) que fue impresa en película para rayos X (Kodak X-Omat). Posteriormente, las membranas fueron liberadas de los anticuerpos mediante un tratamiento reductor (SDS 2%, β -mercaptoetanol 100 mM, Tris-HCl 62.5 mM; a 50°C durante 30 minutos) y se realizó la detección de las formas completas de Stat1, AKT y c-Jun con los anticuerpos específicos (todos de Santa Cruz Biotechnologies; 1/200). El EMSA fue realizado con 10 μ g de proteína nuclear y con la sonda de oligonucleótidos de ADN de doble cadena 5'-CATGTTATGCATATTCCTGTAAGTG-3' (Santa Cruz Biotechnologies) marcada con 32 P en el extremo 3' (los nucleótidos subrayados corresponden al sitio específico para la unión de Stat1, GAS -gamma interferon activating sequence-). Las reacciones de unión fueron realizadas durante 10 minutos a temperatura ambiente en amortiguador 1X (Tris-HCl 50 mM, glicerol 20 %, NaCl 250 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 2.5 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM), con 1 μ g de poly(dI-dC) y 50 o 100 veces de exceso molar de sonda no marcada (sonda fría) como competidor o anticuerpos de Supershift contra Stat1 y phospho-Stat1 (Tyr 701) (Santa Cruz Biotechnologies) cuando fue necesario. Los complejos de proteína fueron separados de la sonda libre por electroforesis en geles de poliacrilamida

nativos al 5% en TBE 0.5X a 500 mA por 2.5 horas. Los geles fueron desecados sobre papel filtro Whatman 3 (3M) y la radioactividad fue registrada en películas para rayos X (Kodak X-Omat) mediante contacto durante 72 horas a -70°C en cassetes para radiografías.

Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados por la prueba Wilcoxon para comparaciones pareadas (sin IFN- γ versus con IFN- γ), y por la prueba de Kruskal-Wallis para diferencias entre los grupos de sujetos con una alfa < 0.05 considerada como significativa usando el programa SPSS (versión 10).

Resultados.

Pacientes y controles. El reclutamiento de pacientes y sujetos sanos se realizó de junio de 2006 a mayo de 2007. En total se obtuvieron 43 sujetos clasificados en tres grupos: 14 de TB, 15 de CCS y 14 de SNI (Tabla 1). Todos los sujetos dieron su consentimiento por escrito bajo información. Los pacientes se reclutaron en el Servicio de Microbiología Clínica del INER y fueron confirmados positivos a *M. tuberculosis* por baciloscopía y cultivo a partir de muestras de esputo. Los convivientes de los pacientes con TB, que no mostraron signos de enfermedad y que resultaron negativos a la baciloscopía y cultivo fueron incluidos en el estudio. Todos los pacientes y sus convivientes mostraron reactividad al PPD superior a 18 mm de induración. Los individuos sanos no relacionados a los pacientes, fueron reclutados del personal de la Facultad de Medicina de la UNAM y manifestaron no tener o haber tenido contacto con personas con tuberculosis y todos resultaron negativos al PPD (induración menor a 5 mm de diámetro) en doble aplicación. Todos los individuos reclutados resultaron negativos a VIH y declararon no tener historia de tuberculosis, diabetes, hepatitis, asma, hipertensión ni estar bajo régimen de corticosteroides.

Tabla 1. Características de los grupos de estudio

	Pacientes con tuberculosis (TB)	Convivientes infectados sanos (CCS)	Sanos no infectados (SNI)
Número de sujetos (Mujeres/Hombres)	14 (7/7)	15 (9/6)	14 (12/2)
Positivos a baciloscopía: n	14	0	NR
Positivos a cultivo: n	14	0	NR
Diámetro min-max de induración por PPD: mm	17-32	18-27	0-3
Mediana de edad (e intervalo): años	41 (18-50)	32 (21-50)	26 (21-32)

NR, no se realizó

Los macrófagos de pacientes con tuberculosis activa son más permisivos a la infección y al crecimiento de *M. tuberculosis* que los macrófagos de sujetos sanos. La respuesta micobactericida al IFN- γ contra *M. tuberculosis* H37Rv se evaluó en los macrófagos de cada uno de los sujetos de estudio por conteo de unidades formadoras de colonia (UFC).

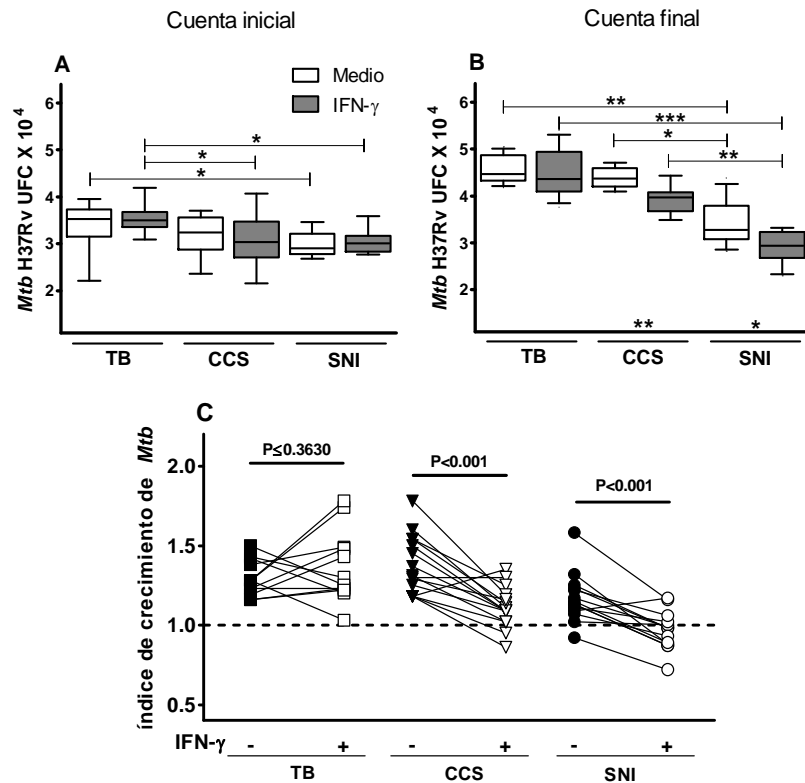


Figura 1. Respuesta micobactericida de macrófagos de pacientes con tuberculosis y sujetos sanos. Los valores de cuartiles (cajas), el valor mínimo y el máximo (bigotes), junto con la mediana (línea horizontal), se obtuvieron de los promedios de UFC contadas al inicio (A) y al final (B) de la infección de macrófagos de pacientes con tuberculosis (TB, n=14), sus convivientes cercanos sanos (CCS, n=15) y sujetos sanos PPD- (SNI, n=14), cultivados con o sin IFN- γ . El índice de crecimiento de *M. tuberculosis* (C) se expresó como el cambio en unidades de crecimiento sobre el basal (1.0) en macrófagos cultivados en medio solamente (-) o con IFN- γ (+) y se calculó al dividir el promedio de UFC contadas al final entre el promedio de UFC contadas al inicio de la infección de macrófagos de cada sujeto presentado por grupo. Las diferencias significativas fueron a una * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

En el tiempo inmediato postinfección (0h), se observó un número mayor de UFC fagocitadas (cuenta inicial, Figura 1A) en los macrófagos del grupo TB, incubados sin y con IFN- γ (Mediana; min-max: 3.53; 2.21-3.95 y 3.50; 3.08-4.20 $\times 10^4$ UFC, respectivamente), al compararse con las UFC contadas de los macrófagos de los grupos control CCS (Mediana; min-max: 3.24; 2.36-3.70 y 3.04; 2.16-4.07 $\times 10^4$ UFC, respectivamente) y SNI (Mediana; min-max: 2.90; 2.68-3.46 y 3.01; 2.76-3.59 $\times 10^4$ UFC, respectivamente) ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis). También a las 48 h postinfección (cuenta final, Figura 1B), se contaron más UFC en los macrófagos del grupo TB sin y con IFN- γ (Mediana; min-max: 4.47; 4.18-5.05 y 4.36; 3.76-5.40 $\times 10^4$ UFC, respectivamente), que en los macrófagos del grupo CCS (Mediana; min-max: 4.36; 4.07-4.71 y 3.96; 3.48-4.43 $\times 10^4$ UFC, respectivamente) y SNI (Mediana; min-max: 3.27; 2.87-4.38 y 2.94; 2.30-3.32 $\times 10^4$ UFC, respectivamente). A pesar de que los macrófagos del grupo TB mostraron mayor actividad fagocítica fueron incapaces de detener el crecimiento de *M. tuberculosis* aún con el pre-tratamiento de IFN- γ , que incluso indujo a los macrófagos de algunos sujetos a permitir un crecimiento mayor de *M. tuberculosis* (Figura 1C). Por el contrario, los macrófagos de los sujetos sanos tanto CCS como SNI, mostraron una reducción en el crecimiento de *M. tuberculosis* cuando fueron estimulados previamente con IFN- γ ($p < 0.01$, Wilcoxon). Estos resultados sugieren que el tratamiento previo de IFN- γ en los macrófagos de pacientes con tuberculosis activa no indujo los mecanismos bactericidas que presumiblemente se activaron en macrófagos de sujetos sanos (CCS y SNI). Cabe subrayar que la inhibición del crecimiento micobacteriano inducida por el IFN- γ fue más pronunciada en sujetos vírgenes a la infección (SNI) ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis).

Los macrófagos de pacientes con tuberculosis responden con un perfil anti-inflamatorio hacia el IFN- γ . Se observó que el estímulo continuo con IFN- γ (500 U/ml por 22h) indujo a los macrófagos del grupo TB a producir muy poco óxido nítrico (24 nanomoles) e IL-12p70 (47.5 pg/mL), pero altos niveles de TNF- α (740 pg/mL) e IL-10 (207 ng/mL), mientras que en los macrófagos de los CCS y SNI, indujo mayor producción de óxido nítrico (50 y 53 nanomoles, respectivamente) e

IL-12p70 (153 y 227 ng/mL, respectivamente) y menor de TNF- α (392 y 436 ng/mL, respectivamente) e IL-10 (18 y 117 pg/mL, respectivamente) ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis). El IFN- γ indujo la producción de TGF- β en los macrófagos sin diferencias entre los grupos de estudio (~ 145 pg/mL, Figura 2).

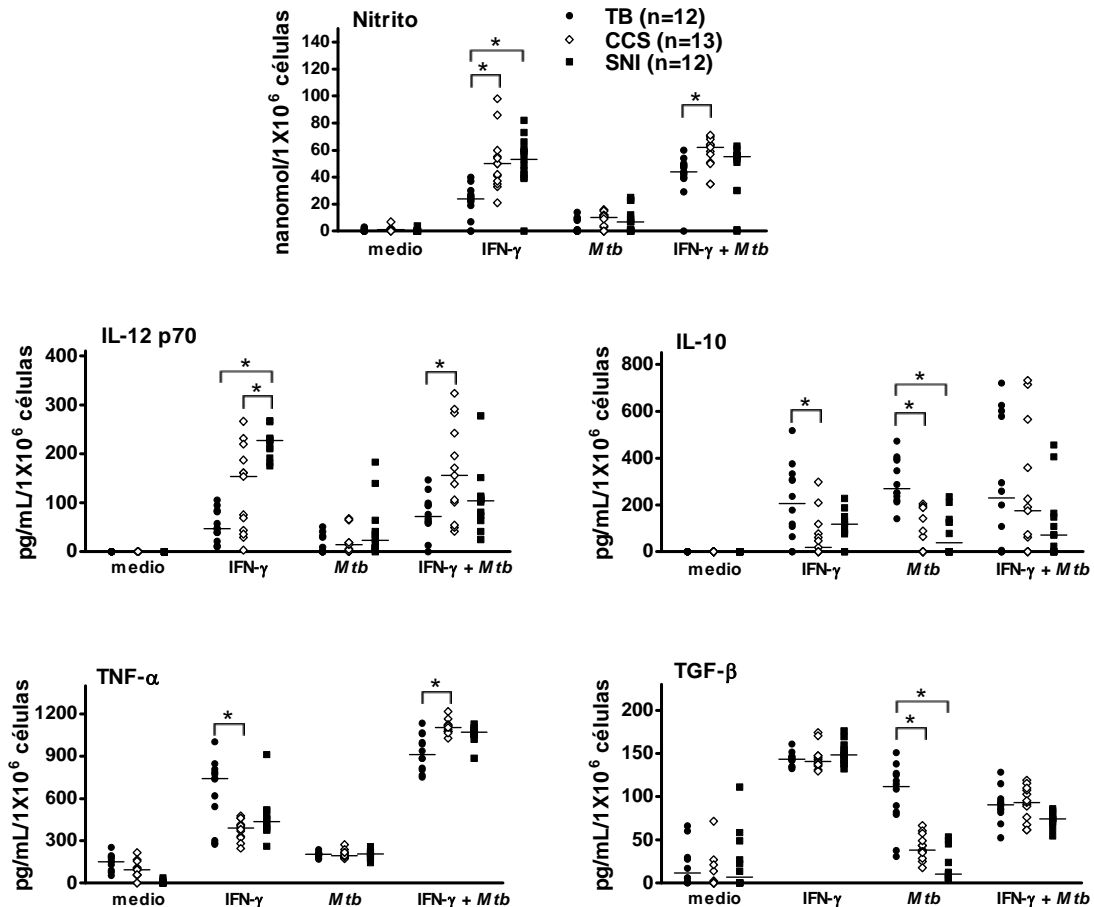


Figura 2. Respuesta anti-inflamatoria al IFN- γ y *M. tuberculosis* en macrófagos de pacientes con tuberculosis activa. Los símbolos representan el promedio de los duplicados de cultivos independientes de macrófagos de pacientes con tuberculosis (TB), sus convivientes cercanos sanos (CCS) y sujetos sanos PPD- (SNI), cultivados en medio solamente, con IFN- γ , con *M. tuberculosis* H37Rv y con ambos. Las líneas horizontales representan los valores de la mediana de cada grupo. Las diferencias significativas fueron a una * $P < 0.05$.

Cabe resaltar que la infección por *M. tuberculosis* H37Rv en los macrófagos sin tratamiento con IFN- γ indujo mayor producción de IL-10 (270 pg/mL) y TGF- β (116

pg/mL) en los de pacientes con tuberculosis activa (TB) que en los de los grupos control (CCS y SNI, IL-10: 0.0 y 39 pg/mL y TGF- β : 38 y 10 pg/mL, respectivamente; Figura 2) ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis). Esta respuesta anti-inflamatoria inducida por la micobacteria se observa muy similar entre los tres grupos previamente tratados con IFN- γ , sin embargo se observa menor producción de óxido nítrico, IL-12p70 y TNF- α en el grupo TB comparado con los sanos ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis; Figura 2). Los resultados de óxido nítrico reflejan la respuesta bactericida al IFN- γ de los macrófagos de cada grupo: mientras mayor fue el control del crecimiento de la micobacteria mayor fue la producción de óxido nítrico. Estos resultados en conjunto indican que los macrófagos del grupo TB responden al IFN- γ y a *M. tuberculosis* de forma diferente a los grupos sanos, lo que sugiere que existe una modificación o alteración en la cascada de transducción de señales del IFN- γ y de los receptores de moléculas de *M. tuberculosis*.

La cascada de señalización del IFN- γ está alterada en los macrófagos de pacientes con tuberculosis activa. La transducción de señales del IFN- γ , dependiente e independiente de Stat1, se analizó. Una vez que se evidenció que la señalización por Stat1, la principal ruta de señales del IFN- γ , se activó rápido y de forma dependiente del IFN- γ en los macrófagos de humano (Figura 3A y B), a la mitad de la máxima intensidad de la señal (45 min, Figura 3A y C) no se observaron interrupciones en la señal del IFN- γ en los macrófagos del grupo TB, ni diferencias en los sujetos de cada grupo en la capacidad de Stat1 de unirse al ADN. Estos resultados indican que las diferencias funcionales mostradas por los macrófagos de cada grupo son independientes de la habilidad del IFN- γ en activar a Stat1, inducir su transporte al núcleo y su unión a la secuencia de ADN complementaria y específica (GAS).

Por lo tanto, debido a que no hay ausencia de la señal inducida por el IFN- γ , se analizó la calidad de ésta a través de la intensidad de la activación de Stat1 y de AKT y c-Jun, como los principales miembros de la ruta independiente de Stat1. La

intensidad de la señal por Stat1 (Stat1 fosforilada) está disminuida en pacientes con tuberculosis activa en comparación con los sujetos sanos y que la activación de c-Jun fue disminuida en los sujetos con TB y en los sujetos SNI, mientras que en los sujetos infectados sanos (CCS) es mayor (Figura 4). La intensidad de activación de AKT fue similar entre los sujetos de cada grupo (Figura 4). Estos resultados indican que existe una alteración en la señalización por IFN- γ en los macrófagos de los pacientes con tuberculosis y sugieren que posiblemente se deba a modificaciones en la regulación de las rutas de señales.

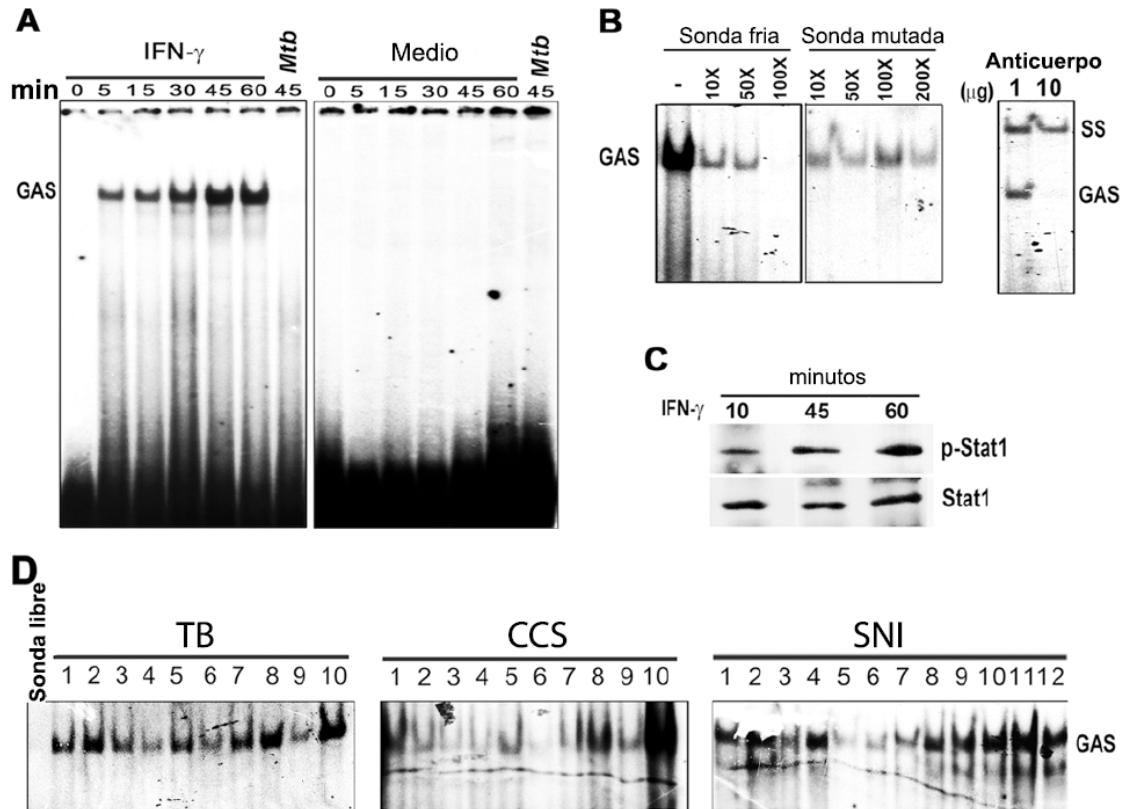


Figura 3. La transducción de señales del IFN- γ dependiente de Stat1 es completa en los macrófagos de pacientes con tuberculosis. Los ensayos de EMSA con 32 P entre la región de ADN complementaria de unión de Stat1 (GAS) y la proteína nuclear obtenida de macrófagos incubados a diferentes tiempos con IFN- γ (A) muestran que la activación, transporte a núcleo y unión es dependiente de IFN- γ . Los ensayos de competencia (B) con la sonda sin 32 P (sonda fría), con la sonda mutada y con anticuerpo anti-Stat1 muestran que la unión de Stat1 a su secuencia consenso es específica. El ensayo de Western blot (C) con anti-Stat1-fosforilada (pStat1) muestra que la intensidad de activación de Stat1 es dependiente de su fosforilación y que incrementa con el tiempo de incubación con IFN- γ . El análisis de los macrófagos de pacientes con tuberculosis activa (TB), sus convivientes cercanos sanos (CCS) y sujetos sanos no infectados (SNI), muestra que la proteína nuclear de macrófagos infectados con *M. tuberculosis* H37Rv e incubados con IFN- γ presentan unión de Stat1 con GAS, demostrando que no hay interrupción de la señalización del IFN- γ y que es funcional.

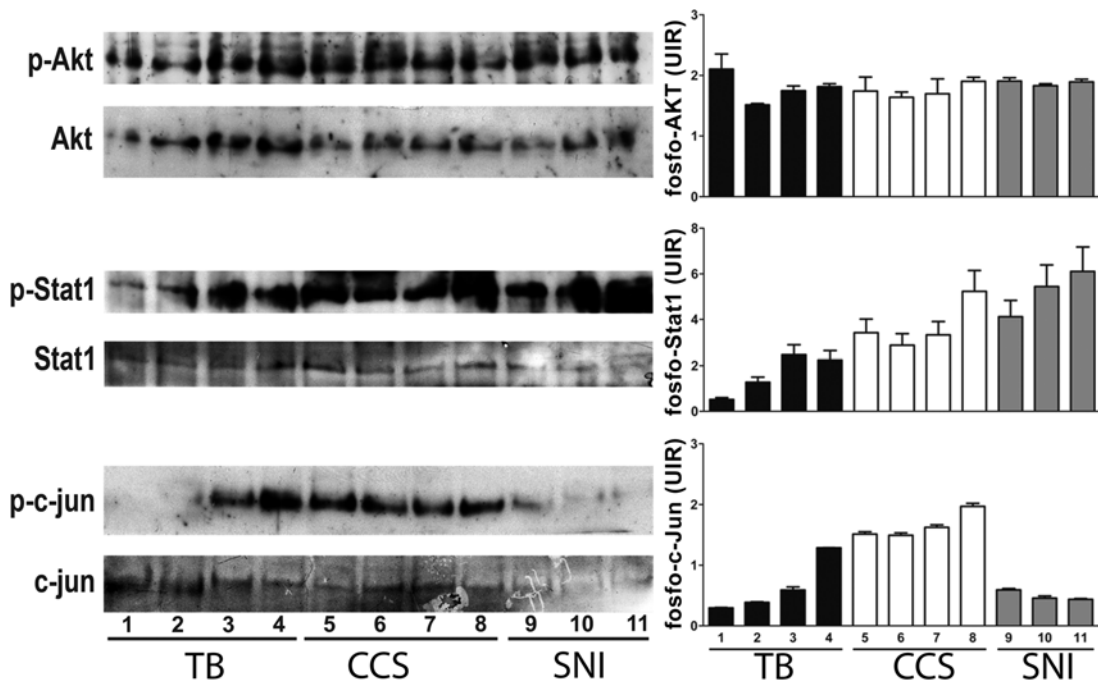


Figura 4. La activación de Stat1 y c-Jun por IFN- γ en macrófagos de pacientes con tuberculosis activa está disminuida. La comparación entre pacientes con tuberculosis activa (TB), sus convivientes cercanos sanos (CCS) y sujetos sanos no infectados (SNI), a través del análisis tipo Western blot de las proteínas totales y fosforiladas: AKT, Stat1 y c-Jun del núcleo de sus macrófagos incubados con IFN- γ (45 min), revela que las unidades de intensidad relativa (UIR) de fosforilación están disminuidas en Stat1 y c-Jun en los macrófagos de pacientes con TB.

Discusión.

Las evidencias que aquí se presentan muestran que los estímulos tanto del IFN- γ como de *M. tuberculosis*, inducen en los macrófagos derivados de monocitos de pacientes con tuberculosis activa una respuesta diferente que aquella inducida en macrófagos de individuos sanos, pero infectados por *M. tuberculosis* (CCS) o controles no infectados (SNI) de la misma comunidad. Las comparaciones entre pacientes y los controles se concentraron en tres puntos: la capacidad de su macrófagos en limitar el crecimiento del patógeno, su respuesta en producción de citoquinas en tiempos de evaluación tempranos, y la intensidad de las señales intracelulares activadas por IFN- γ .

Los macrófagos y los linfocitos productores de IFN- γ se consideran los efectores principales de la respuesta inmune protectora contra la tuberculosis. Estas células mantienen la contención de la micobacteria en lesiones granulomatosas, evitando su diseminación y por lo tanto la manifestación clínica de la infección, conocido como infección latente (Ulrichs *et al.*, 2006). Sin embargo, en menos del 10% de los individuos infectados, la infección progresa a la enfermedad activa ante una respuesta inmune TH1 prominente con la presencia de IFN- γ , indicando una deficiencia en la respuesta de los macrófagos al IFN- γ .

Como el IFN- γ aumenta la función bactericida de los macrófagos estimulando la síntesis de reactivos intermedios de oxígeno y del nitrógeno como el óxido nítrico, el nivel del crecimiento micobacteriano intracelular se correlacionó con la respuesta inmune en condiciones fisiológicas (Laochumroonvorapong P, 1997). En nuestro estudio, el tratamiento con IFN- γ llevó a una disminución en el crecimiento de *M. tuberculosis* en macrófagos de ambos grupos control, pero no en el grupo TB (Figura 1C). Este efecto no se debe a fagocitosis porque el tratamiento con IFN- γ no redujo el número de bacterias fagocitadas (Figura 1A). Sin embargo, las diferencias en las cuentas de fagocitosis entre macrófagos del grupo TB y el grupo CCS sólo se presentaron bajo el tratamiento de IFN- γ (Figura 1B). Estas diferencias pueden ser explicadas por diferencias en la densidad de

receptores de manosa en la superficie de los macrófagos que está regulada por la acción del IFN- γ (Harris *et al.*, 1992). Los receptores de manosa, además de los de complemento, median la fagocitosis de *M. tuberculosis* y dirigen la biogénesis del fagosoma de este (Kang *et al.*, 2005), hacia la permisividad intracelular inhibiendo los efectos pro-inflamatorios inducidos por las moléculas de *M. tuberculosis* a través de los TLR2 y TLR4 (Kang *et al.*, 1998, Schlesinger, 1993, Schlesinger *et al.*, 1990, Underhill *et al.*, 1999). La baja densidad superficial del receptor de manosa en los macrófagos de humano se traduce en menor fagocitosis de *M. tuberculosis* (Schlesinger, 1993). Por lo tanto, los niveles altos de fagocitosis de *M. tuberculosis* y de producción de IL-10 y TGF- β y bajos de IL-12 por los macrófagos del grupo TB, sugieren una mayor densidad del receptor de manosa (Chang JS, 2006). Aunque Sánchez *et al.* (2006), no observaron diferencias en la densidad de este receptor (CD206) entre monocitos de pacientes con tuberculosis activa y de tuberculosis latente, pero si en las moléculas de superficie CD14, HLA-DR y CD36 que correlacionaron con apoptosis (Sanchez *et al.*, 2006). No obstante, la acción del IFN- γ sobre los macrófagos incrementa su densidad o su actividad en mayor grado en los macrófagos TB (Raveh *et al.*, 1998). Por lo que resulta importante estudiar la densidad de este y otros receptores de respuesta inmune de macrófagos en el futuro.

La micobacteria creció en forma más abundante en los macrófagos del grupo TB que en los macrófagos de los grupos control, de los cuales el grupo SNI fue el que presentó el mejor control del crecimiento. En realidad, los macrófagos del grupo TB son más permisivos al crecimiento de *M. tuberculosis* aún con el tratamiento previo de IFN- γ . Estos resultados indican que la respuesta bactericida de los macrófagos al IFN- γ es reducida en sujetos con TB activa.

El control de *M. tuberculosis* efectuado por los macrófagos de sujetos sanos en este estudio, discrepa de la noción previa que el IFN- γ no mejora la respuesta bactericida de los macrófagos derivados de monocitos de humano hacia *M. tuberculosis* (Douvas *et al.*, 1985, Rook *et al.*, 1986). Esto puede deberse a que

los tiempos de evaluación de la actividad micobactericida de los macrófagos en el presente estudio son diferentes a los previamente publicados. Se observó que después del tercer día de infección las células comenzaron a morir, lo que afecta el desempeño del conjunto de células, por lo que se decidió realizar la evaluación dentro de las primeras 48 h permitiendo la multiplicación de la bacteria sin afectar significativamente la viabilidad del cultivo. Está ampliamente documentado que la infección por *M. tuberculosis* induce la muerte de macrófagos, que se acelera con el IFN- γ (Bonecini-Almeida *et al.*, 1998, Placido *et al.*, 1997). Al morir los macrófagos en un cultivo disminuye el número y por lo tanto el ataque microbicida y se incrementa la viabilidad de *M. tuberculosis*. Por lo que otros estudios muestran que los macrófagos de humano tienen una reducción ligera del crecimiento de *M. tuberculosis* o inclusive hasta mayor en condiciones de cultivo con IFN- γ (Douvas *et al.*, 1985).

Después de haber observado que los macrófagos controlaron el crecimiento de *M. tuberculosis* por el efecto del IFN- γ , se investigó la producción de óxido nítrico (NO) como uno de los principales mecanismos bactericidas utilizado por los macrófagos. Consistentemente, los cultivos de macrófagos con baja producción de NO tuvieron mayor número de bacterias vivas (UFC), mientras que los altos productores de NO tuvieron los menores. Por lo que sugiere que existe una alta asociación entre la producción de NO y la viabilidad de la micobacteria. Concordantemente, el tratamiento de IFN- γ mostró que los macrófagos del grupo de pacientes con TB activa fueron bajos productores de NO comparados con los grupos CCS y SNI, siendo éstos últimos los que produjeron más NO (Figura 2). Este resultado demuestra que la producción de NO es reducida en los macrófagos del grupo TB comparado con los sujetos sanos. También indica de forma importante que no hay ausencia en la respuesta al IFN- γ por parte de estos macrófagos o interrupción de su señalización, debido a que el IFN- γ también indujo la producción de TNF- α e IL-10 en estas células en mayor número que las células de los sujetos sanos (Figura 2). Más bien lo que se sugiere es que posiblemente existe una regulación de la señalización del IFN- γ distinta en estas

células. Park GY et al. (2004), no encontraron diferencias en la producción de TNF- α después del estímulo con IFN- γ previo al estímulo con LPS en macrófagos de pacientes con TB clínica al compararse con los controles sanos (Park *et al.*, 2006). Sin embargo, el uso del LPS en ese estudio enmascara las posibles diferencias entre ambos grupos en la inducción de TNF- α por el IFN- γ , ya que el LPS también es capaz de estimular su producción por una ruta de señales distinta que puede involucrar a la del IFN- γ (Kovarik *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 2001, Okugawa *et al.*, 2003).

Debido a que en este estudio los macrófagos de los pacientes con TB activa respondieron al IFN- γ de forma diferente a los grupos control y a lo previamente publicado, se analizó la señalización principal del IFN- γ , la ruta Jak2/Stat1 en los tres grupos a través de la técnica de retardo de movilidad electroforética en gel (Electrophoretic Mobility Shift Assay – EMSA -). El EMSA permite evaluar la unión de Stat1 con la secuencia consenso de ADN (GAS) de forma específica. Se utilizó el EMSA con extractos proteicos de núcleos purificados de los macrófagos y permitió evaluar a Stat1 en su forma fosforilada, homo-dimerizada y trasladada al núcleo, eventos esenciales para la activación de la transcripción génica por el IFN- γ . Sorpresivamente, no se encontraron diferencias entre los grupos ni entre los individuos de cada grupo (Figura 3), lo que indica que las diferencias en la respuesta al IFN- γ no se deben a alteraciones en la funcionalidad de Stat1. Estos resultados confirman que la alteración de la principal molécula en la ruta de señales del IFN- γ no forma parte de la causalidad de TB pero si de susceptibilidad a micobacteriosis atípicas y algunos virus (Dupuis et al., 2001, Dupuis *et al.*, 2003). Condos R et al., encontraron que la respuesta refractaria al IFN- γ en macrófagos alveolares de pacientes con tuberculosis resistente a múltiples fármacos, se restituyó con el tratamiento de IFN- γ recombinante por la reactivación de Stat1 y mejoró el curso clínico de los pacientes (Condos *et al.*, 2003). Estos datos confirman no solo que el sistema de transducción de señales del IFN- γ es funcional y que este es esencial en el control de la enfermedad, pero

también que la respuesta de los macrófagos al IFN- γ está alterada en la tuberculosis activa. Existen evidencias sobre la alteración de la respuesta del macrófago al IFN- γ causada por la infección de éstos por *M. tuberculosis* (Ting *et al.*, 1999, Banaiee *et al.*, 2006b, Fortune *et al.*, 2004), lo que podría ser considerado como la causa de la disfuncionalidad de los macrófagos en el control de la infección y el progreso a la enfermedad clínica a pesar de la presencia del IFN- γ . No obstante, solamente el 10% de los individuos infectados manifiestan la enfermedad clínica o activa, lo que indica que a pesar de los efectos deletéreos de la micobacteria sobre la respuesta del macrófago al IFN- γ , no es un evento que resulte en la manifestación de la enfermedad en la mayoría de los casos.

En realidad, nuestras observaciones describen una activación alterada del macrófago de TB por el IFN- γ . ¿Cómo esta respuesta se relaciona con la bien documentada activación “clásica” del macrófago por el IFN- γ ? la cual involucra la regulación positiva de un gran número de genes cuyos productos tienen efectos sobre el control de la infección, aún no está completamente claro. Una explicación posible es la regulación de la ruta de señales del IFN- γ por intercomunicación con otras cascadas de señales (crosstalk signal transduction regulation), que resulta en la represión de genes que habitualmente se activan o viceversa, por el mismo estímulo en el macrófago (Hu *et al.*, 2007). La señalización del IFN- γ está regulada por este mecanismo (Schroder *et al.*, 2006, Ramana *et al.*, 2000). En el presente estudio se encontró que la activación de Stat1 es reducida en los macrófagos del grupo TB (Figura 4), que consecuentemente resultó en menor activación de los genes de NO (*iNOS*) e IL-12, como lo indican los bajos niveles de ambos productos (Figura 3). Esto correlaciona la calidad de la señal de Stat1 tanto con la funcionalidad del macrófago como con el estado de infección del hospedero del que proviene. Está bien documentado que mientras mayor la activación de Stat1 mayor la activación de los genes dependientes de IFN- γ relacionados con el control de *M. tuberculosis* (Hu *et al.*, 2002).

La activación de otros factores de transcripción corriente abajo de varias rutas de señales que convergen, es necesaria para activar, incrementar o inhibir la transcripción de genes que responden al IFN- γ de forma dependiente de Stat1 (Ramana *et al.*, 2000, Ramana *et al.*, 2001, Ramana *et al.*, 2002). Además de la ruta principal de señales Jak2-Stat1, IFN- γ activa también a otras cinasas como: Pyk2, PI3-K/Akt, protein-cinasas activadas por mitógenos (MAPK), incluyendo a las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2), MAPK p38 y cinasas c-Jun N-terminal/protein-cinasas activadas por estrés (JNKs/SAPKs) (Ramana *et al.*, 2002). La activación de c-Jun es necesaria para la activación de genes de respuesta a IFN- γ a través de AP-1, pero de forma independiente de la señalización de Stat1 (Gough *et al.*, 2007). En este estudio se evidenció que en los macrófagos de los individuos infectados sanos (CCS), c-Jun es activado con mayor intensidad que en los macrófagos de individuos enfermos (TB) y aún más que en los de individuos sanos sin infección (SNI) los cuales fueron los que presentaron mayor intensidad en la fosforilación de Stat1 (Tyr 701) que los otros grupos (Figura 4). Lo que demuestra que la activación de c-Jun, en paralelo a Stat1, tiene una función importante en la respuesta al IFN- γ , cuando los individuos están infectados por *M. tuberculosis*. Por otro lado, la activación de AKT fue similar entre los grupos, indicando que la modificación observada en rutas de señalización alternas a Stat1 activadas por IFN- γ es específica y refuerza que existe un mecanismo de regulación de las señales que se relaciona con el estado fisiopatológico de la célula generado por la inflamación o infección en el hospedero. En circunstancias fisiológicas (no infección o enfermedad por tuberculosis), el IFN- γ induce la regulación negativa del gene IL-10 en el macrófago a través de GSK3. GSK3 reduce la expresión de AP-1 lo que contribuye a la disminución de su unión con el ADN y por consecuencia baja expresión de IL-10 (Hu *et al.*, 2006). La inducción por IFN- γ de altos niveles de IL-10 junto con la baja activación de c-Jun en macrófagos de sujetos con tuberculosis (TB) sugiere que este mecanismo está alterado.

Los resultados de este estudio proveen evidencia que la disfunción de la respuesta al IFN- γ en los macrófagos de pacientes con tuberculosis activa, es dependiente no solo de la señalización por Stat1, sino también de la activación de AP-1 (c-Jun). Actualmente, se desconoce disfunción alguna de las proteínas c-Jun con referencia a polimorfismos o mutaciones asociadas con susceptibilidad a enfermedades por micobacterias (Fortin *et al.*, 2007). Sin embargo, las alteraciones en la regulación de la expresión y activación de proteínas AP-1 (c-jun/c-fos) se han descrito ampliamente en patologías humanas de inflamación crónica, resultando en modificaciones de la funcionalidad del macrófago en respuesta a estímulos o citoquinas inflamatorias (Wagner *et al.*, 2005). La heterogeneidad de fenotipos funcionales de macrófagos se ha visto alterada en enfermedades inflamatorias crónicas tales como el asma, fibrosis de órganos, artritis, obesidad y en enfermedades granulomatosas predominando un fenotipo de macrófagos que responden de forma anti-inflamatoria a los estímulos pro-inflamatorios y son reparadores de tejido (“healers” u “osteoclast-like”) (Gil *et al.*, 2007, Kawanaka *et al.*, 2002, Scherberich *et al.*, 1999). Los monocitos circulantes de pacientes con tuberculosis activa, a diferencia de los de individuos sanos o con infección latente por *M. tuberculosis*, son más abundantes (Sanchez *et al.*, 2006), pero producen menos TNF-alfa y más IL-10 y son más propensos a morir por necrosis en respuesta al estímulo con *M. tuberculosis* (Gil *et al.*, 2004). Como resultado de la inflamación crónica en la tuberculosis, la pérdida de la homeostasis en el hospedero conduce a una polarización de los fenotipos de macrófagos y propicia poblaciones funcionales que responden diferente hacia el mismo estímulo. Los fenotipos de macrófagos de humano que corresponden a esta polarización fueron designados como poblaciones M1 y M2 (por transposición errónea de los fenotipos TH1 y TH2 de los linfocitos T). El fenotipo M2 es muy similar al fenotipo de los macrófagos del grupo TB de este estudio; producen altos niveles de IL-10 y muy bajos de IL-12, son más fagocíticos pero tienen menor capacidad bactericida que el fenotipo M1, que está más relacionado al fenotipo de activación clásica del macrófago (Anderson *et al.*, 2002). Adicionalmente, el macrófago M2 presenta muy poco control del crecimiento de *M. tuberculosis* y está

asociado al control deficiente de la enfermedad (Kahnert *et al.*, 2006, Verreck *et al.*, 2004). Por otro lado, los macrófagos M1 y M2 conservan su fenotipo funcional opositor aún después de la activación con estímulos como el LPS, zymosan, IFN- γ y CD40L (Verreck *et al.*, 2006), lo que demuestra que su fenotipo no es transitorio o reversible. En poblaciones humanas la polarización de macrófagos ha sido previamente identificada tanto *in vitro* como *in vivo* al definir subpoblaciones de monocitos con propiedades específicas diferentes y con marcadores de superficie específicos (Passlick *et al.*, 1989, Moreno-Altamirano *et al.*, 2007). Tomando en cuenta los antecedentes de polarización de los fenotipos funcionales del macrófago en enfermedades inflamatorias crónicas y el parecido que existe entre el fenotipo de los macrófagos M2 y los macrófagos de pacientes con tuberculosis activa (TB), es posible postular que en estos individuos ocurre una polarización de las subpoblaciones de monocitos en la que domina el fenotipo “reparador” o anti-inflamatorio, que afecta la respuesta eficaz contra la infección por *M. tuberculosis* inducida por estímulos conocidos como protectores como el IFN- γ .

El presente estudio muestra que los macrófagos de pacientes con tuberculosis activa responden al IFN- γ de forma anti-inflamatoria y esto es derivado de la alteración en la señalización del IFN- γ por la vía del Stat1 y AP-1, sugiriendo un mecanismo de regulación alterado o diferente de estas rutas inducido por la propia inflamación crónica.

Referencias

- Akaike T, Maeda H 2000. Nitric oxide and virus infection. *Immunology* 101: 300-308.
- Anderson CF, Mosser DM 2002. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J.Leukoc.Biol.* 72: 101-106.
- Armstrong JA, Hart PD 1971. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J.Exp.Med.* 134: 713-740.
- Awomoyi AA, Nejentsev S, Richardson A, Hull J, Koch O, Podinovskaia M, Todd JA, McAdam KP, Blackwell JM, *et al.* 2004. No association between interferon-gamma receptor-1 gene polymorphism and pulmonary tuberculosis in a Gambian population sample. *Thorax* 59: 291-294.
- Banaiee N, Jacobs WR, Jr., Ernst JD 2006a. Regulation of *Mycobacterium tuberculosis* whiB3 in the mouse lung and macrophages. *Infect Immun* 74: 6449-6457.
- Banaiee N, Kincaid EZ, Buchwald U, Jacobs WR, Jr., Ernst JD 2006b. Potent inhibition of macrophage responses to IFN-gamma by live virulent *Mycobacterium tuberculosis* is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2. *J Immunol* 176: 3019-3027.
- Beggs CB, Noakes CJ, Sleigh PA, Fletcher LA, Siddiqi K 2003. The transmission of tuberculosis in confined spaces: an analytical review of alternative epidemiological models. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 7: 1015-1026.
- Belosevic M, Davis CE, Meltzer MS, Nacy CA 1988. Regulation of activated macrophage antimicrobial activities. Identification of lymphokines that cooperate with IFN-gamma for induction of resistance to infection. *J.Immunol.* 141: 890-896.
- Bhatt K, Salgame P 2007. Host Innate Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin.Immunol* 27: 347-362.
- Birkness KA, Guarner J, Sable SB, Tripp RA, Kellar KL, Bartlett J, Quinn FD 2007. An in vitro model of the leukocyte interactions associated with granuloma formation in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Cell Biol* 85: 160-168.
- Bloom BR, (1994) *Tuberculosis. Pathogenesis, protection, and control.*
- Bloom BR, Murray CJ 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 257: 1055-1064.

- Bocchino M, Galati D, Sanduzzi A, Colizzi V, Brunetti E, Mancino G 2005. Role of mycobacteria-induced monocyte/macrophage apoptosis in the pathogenesis of human tuberculosis. *Int.J Tuberc.Lung Dis.* 9: 375-383.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu.Rev.Immunol.* 15: 749-795.
- Bonecini-Almeida MG, Chitale S, Boutsikakis I, Geng J, Doo H, He S, Ho JL 1998. Induction of in vitro human macrophage anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity: requirement for IFN-gamma and primed lymphocytes. *J.Immunol.* 160: 4490-4499.
- Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, *et al.* 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285: 732-736.
- Carranza C, Juarez E, Torres M, Ellner JJ, Sada E, Schwander SK 2006. *Mycobacterium tuberculosis* growth control by lung macrophages and CD8 cells from patient contacts. *Am J Respir.Crit Care Med.* 173: 238-245.
- Co DO, Hogan LH, Kim SI, Sandor M 2004. Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship. *Clinical Immunology* 113: 130-136.
- Collins HL 2003. The role of iron in infections with intracellular bacteria. *Immunol.Lett.* 85: 193-195.
- Condos R, Raju B, Canova A, Zhao BY, Weiden M, Rom WN, Pine R 2003. Recombinant gamma interferon stimulates signal transduction and gene expression in alveolar macrophages in vitro and in tuberculosis patients. *Infect Immun* 71: 2058-2064.
- Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp.Med.* 175: 1111-1122.
- de Jong BC, Hill RC, Aiken A, Jeffries DJ, Onipede A, Small RM, Adegbola RA, Corrah TR 2007. Clinical presentation and outcome of tuberculosis patients infected by *M-africanum* versus *M-tuberculosis*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 11: 450-456.
- de la Barrera S, Aleman M, Musella R, Schierloh P, Pasquinelli V, Garcia V, Abbate E, Sasiain MC 2004. IL-10 down-regulates costimulatory molecules on *Mycobacterium tuberculosis*-pulsed macrophages and impairs the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients. *Clin.Exp.Immunol* 138: 128-138.

- Ding AH, Nathan CF 1988. The measurement of cytochrome b559 in polymorphonuclear leukocytes and macrophages in the presence of hemoglobin or mitochondrial cytochromes. *Anal Biochem* 175: 22-29.
- Donoghue HD, Spigelman M, Greenblatt CL, Lev-Maor G, Bar-Gal GK, Matheson C, Vernon K, Nerlich AG, Zink AR 2004. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *Lancet Infect.Dis.* 4: 584-592.
- Douvas GS, Looker DL, Vatter AE, Crowle AJ 1985. Gamma interferon activates human macrophages to become tumoricidal and leishmanicidal but enhances replication of macrophage-associated mycobacteria. *Infect Immun* 50: 1-8.
- Dupuis S, Dargemont C, Fieschi C, Thomassin N, Rosenzweig S, Harris J, Holland SM, Schreiber RD, Casanova JL 2001. Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science* 293: 300-303.
- Dupuis S, Jouanguy E, Al Hajjar S, Fieschi C, Al Mohsen IZ, Al Jumaah S, Yang K, Chaggier A, Eidenschenk C, *et al.* 2003. Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat.Genet.* 33: 388-391.
- Dye C 2006. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet* 367: 938-940.
- Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC 1999. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA* 282: 677-686.
- Emile JF, Patey N, Altare F, Lamhamedi S, Jouanguy E, Boman F, Quillard J, Lecomte-Houcke M, Verola O, *et al.* 1997. Correlation of granuloma structure with clinical outcome defines two types of idiopathic disseminated BCG infection. *J Pathol.* 181: 25-30.
- Ernst JD 1998. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 66: 1277-1281.
- Fauci AS, Eugene B, Dennis LK, Stephen LH, Dan LL, Jameson JL, Joseph L, (2008) *Harrison Principios de Medicina Interna*. MCGRAW-HILL.
- Fenhalls G, Wong A, Bezuidenhout J, van Helden P, Bardin P, Lukey PT 2000. In situ production of gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor alpha mRNA in human lung tuberculous granulomas. *Infect Immun* 68: 2827-2836.
- Flynn JL, Chan J 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu.Rev.Immunol.* 19: 93-129.

- Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR 1993. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp.Med.* 178: 2249-2254.
- Fortin A, Abel L, Casanova JL, Gros P 2007. Host Genetics of Mycobacterial Diseases in Mice and Men: Forward Genetic Studies of BCG-osis and Tuberculosis. *Annu.Rev Genomics Hum.Genet.*
- Fortune SM, Solache A, Jaeger A, Hill PJ, Belisle JT, Bloom BR, Rubin EJ, Ernst JD 2004. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits macrophage responses to IFN-gamma through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 172: 6272-6280.
- Fraser DA, Bulat-Kardum L, Knezevic J, Babarovic P, Matakovic-Mileusnic N, Dellacasagrande J, Matanic D, Pavelic J, Beg-Zec Z, *et al.* 2003. Interferon-gamma receptor-1 gene polymorphism in tuberculosis patients from Croatia. *Scand.J.Immunol.* 57: 480-484.
- Giacomini E, Iona E, Ferroni L, Miettinen M, Fattorini L, Orefici G, Julkunen I, Coccia EM 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.
- Gil A, Maria AC, Gil-Campos M, Canete R 2007. Altered signalling and gene expression associated with the immune system and the inflammatory response in obesity. *Br.J.Nutr.* 98 Suppl 1: S121-S126.
- Gil DP, Leon LG, Correa LI, Maya JR, Paris SC, Garcia LF, Rojas M 2004. Differential induction of apoptosis and necrosis in monocytes from patients with tuberculosis and healthy control subjects. *J.Infect.Dis.* 189: 2120-2128.
- Goerdts S, Politz O, Schledzewski K, Birk R, Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Klemke CD, Dippel E, *et al.* 1999. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology* 67: 222-226.
- Gordon S 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat.Rev.Immunol.* 3: 23-35.
- Gough DJ, Sabapathy K, Ko EY, Arthur HA, Schreiber RD, Trapani JA, Clarke CJ, Johnstone RW 2007. A novel c-Jun-dependent signal transduction pathway necessary for the transcriptional activation of interferon gamma response genes. *J.Biol.Chem.* 282: 938-946.
- Harries AD, Dye C 2006. Tuberculosis. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 100: 415-431.
- Harris N, Super M, Rits M, Chang G, Ezekowitz RA 1992. Characterization of the murine macrophage mannose receptor: demonstration that the downregulation of receptor expression mediated by interferon-gamma occurs at the level of transcription. *Blood* 80: 2363-2373.

- Hickman-Davis JM, Fang FC, Nathan C, Shepherd VL, Voelker DR, Wright JR 2001. Lung surfactant and reactive oxygen-nitrogen species: antimicrobial activity and host-pathogen interactions. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 281: L517-L523.
- Hu X, Chen J, Wang L, Ivashkiv LB 2007. Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *J.Leukoc.Biol.* 82: 237-243.
- Hu X, Herrero C, Li WP, Antoniv TT, Falck-Pedersen E, Koch AE, Woods JM, Haines GK, Ivashkiv LB 2002. Sensitization of IFN-gamma Jak-STAT signaling during macrophage activation. *Nat.Immunol.* 3: 859-866.
- Hu X, Paik PK, Chen J, Yarilina A, Kockeritz L, Lu TT, Woodgett JR, Ivashkiv LB 2006. IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* 24: 563-574.
- Humphreys IR, Stewart GR, Turner DJ, Patel J, Karamanou D, Snelgrove RJ, Young DB 2006. A role for dendritic cells in the dissemination of mycobacterial infection. *Microbes.Infect.* 8: 1339-1346.
- Kahnert A, Seiler P, Stein M, Bandermann S, Hahnke K, Mollenkopf H, Kaufmann SH 2006. Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur.J Immunol* 36: 631-647.
- Kang BK, Schlesinger LS 1998. Characterization of mannose receptor-dependent phagocytosis mediated by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. *Infection and Immunity* 66: 2769-2777.
- Kang PB, Azad AK, Torrelles JB, Kaufman TM, Beharka A, Tibesar E, Desjardin LE, Schlesinger LS 2005. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp.Med.* 202: 987-999.
- Kaufmann SH 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat.Rev Immunol* 1: 20-30.
- Kaufmann SH 2002. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann.Rheum.Dis.* 61 Suppl 2: ii54-ii58.
- Kaufmann SH 2005. Introduction. Rational vaccine development against tuberculosis: "Those who don't remember the past are condemned to repeat it". *Microbes Infect* 7: 897-898.
- Kaufmann SH, Cole ST, Mizrahi V, Rubin E, Nathan C 2005. *Mycobacterium tuberculosis* and the host response. *J Exp.Med.* 201: 1693-1697.

- Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, *et al.* 2002. CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 46: 2578-2586.
- Kawatsu H, Hasegawa Y, Takagi E, Shimokata K 1991. Human alveolar macrophages of anergic patients with lung cancer lack the responsiveness to recombinant interferon gamma. *Chest* 100: 1277-1280.
- Kincaid EZ, Ernst JD 2003. *Mycobacterium tuberculosis* exerts gene-selective inhibition of transcriptional responses to IFN-gamma without inhibiting STAT1 function. *J Immunol* 171: 2042-2049.
- Koch R 1982. Classics in infectious diseases. The etiology of tuberculosis: Robert Koch. Berlin, Germany 1882. *Rev.Infect.Dis.* 4: 1270-1274.
- Kovarik P, Stoiber D, Novy M, Decker T 1998. Stat1 combines signals derived from IFN-gamma and LPS receptors during macrophage activation. *EMBO J.* 17: 3660-3668.
- Latchumanan VK, Balkhi MY, Sinha A, Singh B, Sharma P, Natarajan K 2005. Regulation of immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* secretory antigens by dendritic cells. *Tuberculosis (Edinb.)* 85: 377-383.
- Lee JY, Sullivan KE 2001. Gamma interferon and lipopolysaccharide interact at the level of transcription to induce tumor necrosis factor alpha expression. *Infect.Immun.* 69: 2847-2852.
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 24: 99-146.
- Lin PL, Pawar S, Myers A, Pegu A, Fuhrman C, Reinhart TA, Capuano SV, Klein E, Flynn JL 2006. Early events in *Mycobacterium tuberculosis* infection in cynomolgus macaques. *Infect.Immun.* 74: 3790-3803.
- Lin Y, Zhang M, Hofman FM, Gong J, Barnes PF 1996. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect.Immun.* 64: 1351-1356.
- Ma J, Chen T, Mandelin J, Ceponis A, Miller NE, Hukkanen M, Ma GF, Konttinen YT 2003. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol.Life Sci.* 60: 2334-2346.
- MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF 1997. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 5243-5248.
- Mansouri D, Adimi P, Mirsaedi M, Mansouri N, Khalilzadeh S, Masjedi MR, Adimi P, Tabarsi P, Naderi M, *et al.* 2005. Inherited disorders of the IL-12-IFN-

- gamma axis in patients with disseminated BCG infection. *Eur.J Pediatr.* 164: 753-757.
- Marino S, Kirschner DE 2004a. The human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* in lung and lymph node. *J.Theor.Biol.* 227: 463-486.
- Marino S, Pawar S, Fuller CL, Reinhart TA, Flynn JL, Kirschner DE 2004b. Dendritic cell trafficking and antigen presentation in the human immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 173: 494-506.
- McDonough KA, Kress Y, Bloom BR 1993. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect Immun* 61: 2763-2773.
- Mehra V, Gong JH, Iyer D, Lin Y, Boylen CT, Bloom BR, Barnes PF 1996. Immune response to recombinant mycobacterial proteins in patients with tuberculosis infection and disease. *J Infect Dis.* 174: 431-434.
- Mehrotra J, Bishai WR 2001. Regulation of virulence genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int.J.Med.Microbiol.* 291: 171-182.
- Mellman I, Steinman RM 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106: 255-258.
- Mohan VP, Scanga CA, Yu K, Scott HM, Tanaka KE, Tsang E, Tsai MM, Flynn JL, Chan J 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.
- Moreno-Altamirano MM, Aguilar-Carmona I, Sanchez-Garcia FJ 2007. Expression of GM1, a marker of lipid rafts, defines two subsets of human monocytes with differential endocytic capacity and lipopolysaccharide responsiveness. *Immunology* 120: 536-543.
- Mosser DM 2003. The many faces of macrophage activation. *J.Leukoc.Biol.* 73: 209-212.
- Nathan CF, Hibbs JB, Jr. 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr.Opin.Immunol.* 3: 65-70.
- Nathan CF, Prendergast TJ, Wiebe ME, Stanley ER, Platzer E, Remold HG, Welte K, Rubin BY, Murray HW 1984. Activation of human macrophages. Comparison of other cytokines with interferon-gamma. *J.Exp.Med.* 160: 600-605.
- Okugawa S, Ota Y, Kitazawa T, Nakayama K, Yanagimoto S, Tsukada K, Kawada M, Kimura S 2003. Janus kinase 2 is involved in lipopolysaccharide-induced activation of macrophages. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 285: C399-C408.

- Pai RK, Pennini ME, Tobian AA, Canaday DH, Boom WH, Harding CV 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.
- Park JS, Tamayo MH, Gonzalez-Juarrero M, Orme IM, Ordway DJ 2006. Virulent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages. *J Leukoc.Biol* 79: 80-86.
- Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74: 2527-2534.
- Pathak SK, Basu S, Basu KK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, Kaisho T, Kundu M, Basu J 2007. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat.Immunol* 8: 610-618.
- Placido R, Mancino G, Amendola A, Mariani F, Vendetti S, Piacentini M, Sanduzzi A, Bocchino ML, Zembala M, et al. 1997. Apoptosis of human monocytes/macrophages in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J.Pathol.* 181: 31-38.
- Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark GR 2000. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene* 19: 2619-2627.
- Ramana CV, Gil MP, Han Y, Ransohoff RM, Schreiber RD, Stark GR 2001. Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN-gamma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 6674-6679.
- Ramana CV, Gil MP, Schreiber RD, Stark GR 2002. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol.* 23: 96-101.
- Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat.Rev.Immunol.* 5: 617-628.
- Raveh D, Kruskal BA, Farland J, Ezekowitz RA 1998. Th1 and Th2 cytokines cooperate to stimulate mannose-receptor-mediated phagocytosis. *J.Leukoc.Biol.* 64: 108-113.
- Raviglione MC 2003. The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis.(Edinb.)* 83: 4-14.
- Reis e S 2004. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr.Opin.Immunol.* 16: 21-25.

- Rook GA, Steele J, Ainsworth M, Champion BR 1986. Activation of macrophages to inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of the effects of recombinant gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. *Immunology* 59: 333-338.
- Russell DG 2007. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat.Rev Microbiol.* 5: 39-47.
- Sanchez MD, Garcia Y, Montes C, Paris SC, Rojas M, Barrera LF, Arias MA, Garcia LF 2006. Functional and phenotypic changes in monocytes from patients with tuberculosis are reversed with treatment. *Microbes.Infect.* 8: 2492-2500.
- Saunders BM, Britton WJ 2007. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol* 85: 103-111.
- Scherberich JE, Nockher WA 1999. CD14⁺⁺ monocytes, CD14⁺/CD16⁺ subset and soluble CD14 as biological markers of inflammatory systemic diseases and monitoring immunosuppressive therapy. *Clin.Chem.Lab Med.* 37: 209-213.
- Schlesinger LS 1993. Macrophage Phagocytosis of Virulent But Not Attenuated Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Is Mediated by Mannose Receptors in Addition to Complement Receptors. *Journal of Immunology* 150: 2920-2930.
- Schlesinger LS, Bellingerkawahara CG, Payne NR, Horwitz MA 1990. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* Is Mediated by Human Monocyte Complement Receptors and Complement Component-C3. *Journal of Immunology* 144: 2771-2780.
- Schroder K, Sweet MJ, Hume DA 2006. Signal integration between IFN γ and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology* 211: 511-524.
- Schwander SK, Torres M, Carranza CC, Escobedo D, Tary-Lehmann M, Anderson P, Toossi Z, Ellner JJ, Rich EA, *et al.* 2000. Pulmonary mononuclear cell responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in healthy household contacts of patients with active tuberculosis and healthy controls from the community. *J Immunol* 165: 1479-1485.
- Segovia-Juarez JL, Ganguli S, Kirschner D 2004. Identifying control mechanisms of granuloma formation during *M. tuberculosis* infection using an agent-based model. *J Theor.Biol* 231: 357-376.
- Shitrit D, Priess R, Peled N, Bishara G, Shlomi D, Kramer MR 2007. Differentiation of *Mycobacterium kansasii* infection from *Mycobacterium tuberculosis* infection: comparison of clinical features, radiological appearance, and outcome. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 26: 679-684.

- Shortman K, Liu YJ 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat.Rev.Immunol.* 2: 151-161.
- Smith I 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin.Microbiol.Rev.* 16: 463-496.
- Sousa AO, Salem JI, Lee FK, Vercosa MC, Cruaud P, Bloom BR, Lagrange PH, David HL 1997. An epidemic of tuberculosis with a high rate of tuberculin anergy among a population previously unexposed to tuberculosis, the Yanomami Indians of the Brazilian Amazon. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 13227-13232.
- Tailleux L, Neyrolles O, Honore-Bouakline S, Perret E, Sanchez F, Abastado JP, Lagrange PH, Gluckman JC, Rosenzweig M, *et al.* 2003. Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *J.Immunol.* 170: 1939-1948.
- Taylor PR, Gordon S, Martinez-Pomares L 2005. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol* 26: 104-110.
- Ting LM, Kim AC, Cattamanchi A, Ernst JD 1999. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *J Immunol* 163: 3898-3906.
- Torres M, Herrera T, Villareal H, Rich EA, Sada E 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.
- Ulrichs T, Kaufmann SH 2006. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol.* 208: 261-269.
- Ulrichs T, Kosmiadi GA, Jorg S, Pradl L, Titukhina M, Mishenko V, Gushina N, Kaufmann SH 2005. Differential organization of the local immune response in patients with active cavitary tuberculosis or with nonprogressive tuberculoma. *J Infect Dis.* 192: 89-97.
- Ulrichs T, Kosmiadi GA, Trusov V, Jorg S, Pradl L, Titukhina M, Mishenko V, Gushina N, Kaufmann SH 2004. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *J Pathol.* 204: 217-228.
- Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A 1999. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96: 14459-14463.

- Vergne I, Chua J, Lee HH, Lucas M, Belisle J, Deretic V 2005. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102: 4033-4038.
- Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, Waal-Malefyt R, *et al.* 2004. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101: 4560-4565.
- Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der ZL, Ottenhoff TH 2006. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J.Leukoc.Biol.* 79: 285-293.
- Wagner EF, Eferl R 2005. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol.Rev.* 208: 126-140.
- Wayne LG, Sohaskey CD 2001. Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annual Review of Microbiology* 55: 139-163.
- WHO, (2007) Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing. In: World Health Organization. Geneva, pp. 277.
- Wilson JV 1996. Diseases of Babylon: an examination of selected texts. *J.R.Soc.Med.* 89: 135-140.
- Wolf AJ, Desvignes L, Linas B, Banaiee N, Tamura T, Takatsu K, Ernst JD 2008. Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J.Exp.Med.* 205: 105-115.
- Wolf AJ, Linas B, Trevejo-Nunez GJ, Kincaid E, Tamura T, Takatsu K, Ernst JD 2007. *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. *J.Immunol.* 179: 2509-2519.
- Wong YL, Sampson S, Germishuizen WA, Goonesekera S, Caponetti G, Sadoff J, Bloom BR, Edwards D 2007. Drying a tuberculosis vaccine without freezing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104: 2591-2595.
- Yang CS, Lee JS, Song CH, Hur GM, Lee SJ, Tanaka S, Akira S, Paik TH, Jo EK 2007. Protein kinase C zeta plays an essential role for *Mycobacterium tuberculosis*-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes/macrophages via Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol.* 9: 382-396.
- Zink AR, Sola C, Reischl U, Grabner W, Rastogi N, Wolf H, Nerlich AG 2003. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J.Clin.Microbiol.* 41: 359-367.

Impaired activation of Stat1 and c-Jun as a possible defect in macrophages of patients with active tuberculosis

H. Esquivel-Solís,*
F. Quiñones-Falconi,[†]
A. Zarain-Herzberg,[‡]
R. I. Amieva-Fernández* and
Y. López-Vidal*

*Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, †Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán and ‡Departamento de Microbiología Clínica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Talpan, Mexico City, Mexico

Accepted for publication 3 June 2009

Correspondence: Y. López-Vidal, Programa de Inmunología Molecular Microbiana, 4° piso Edificio de Investigación, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, Mexico City, Mexico.
E-mail: lvidal@servidor.unam.mx

Introduction

One-third of the total human population is infected with *Mycobacterium tuberculosis*. This bacterium causes illness in up to 9 million people annually and is responsible for three deaths every minute worldwide [1,2]. Tuberculosis (TB) is a disease which infects people with apparently normal immune systems [3]. Of all the population infected with *M. tuberculosis*, approximately 10% progress to disease [2]. Characterization of immunity from infected but healthy people (latency) has shown that *M. tuberculosis* persists within professional phagocytes in granulomas organizing the immune cell response to restrain bacterial growth [4].

Summary

Studies of patients with active tuberculosis (TB) and infected healthy individuals have shown that interferon (IFN)- γ is present in sites of *Mycobacterium tuberculosis* infection in comparable levels. This suggests that there is a deficiency in the macrophage response to IFN- γ in TB patients. We used recombinant human IFN- γ to stimulate adherent monocyte-derived macrophages from three groups of people: patients with active tuberculosis (TBP), their healthy household contacts (HHC) and healthy uninfected controls from the community (CC). We then evaluated the ability of the macrophages to inhibit the growth of *M. tuberculosis* H37Rv as well as their cytokine profile at early in infection (48 h). After IFN- γ treatment, macrophages of healthy individuals (HHC and CC) controlled *M. tuberculosis* growth and produced mainly nitric oxide (NO) and interleukin (IL)-12p70, whereas TBP macrophages did not kill *M. tuberculosis*. Additionally, TBP macrophages produced low levels of NO and IL-12p70 and high levels of tumour necrosis factor (TNF)- α and IL-10. Transforming growth factor (TGF)- β levels were similar among all three groups. *M. tuberculosis* infection had little effect on the cytokine response after IFN- γ stimulus, but infection alone induced more IL-10 and TGF- β in TBP macrophages. There were no differences in Stat1 nuclear translocation and DNA binding between the groups. However, the phosphorylated Stat1 and c-Jun (AP-1) in nuclear protein extracts was diminished in TBP macrophages compared to macrophages of healthy individuals. These results indicate an impairment of Stat1-dependent and Stat1-independent IFN- γ signalling in macrophages of people with active tuberculosis, suggesting a different molecular regulation that could impact macrophage functionality and disease outcome.

Keywords: healthy household contacts, IFN- γ signalling, macrophage, TB control, tuberculosis

This is due in part to the interaction of macrophages with antigen-dependent interferon (IFN)- γ -producing T cells [5–7] that mediate macrophage activation [5,8,9]. Activation of the macrophage with IFN- γ prior to infection with *M. tuberculosis* enables the host cell to overcome the block in phagosome maturation, which leads to bacterial lysis through the production of nitric oxide (NO) and reactive oxygen intermediates (ROI) [10], thus preventing bacterial dispersion and disease [11]. IFN- γ also transforms the macrophage into a potent antigen-presenting cell that induces the adaptive immune response with a dominant TH1 profile by releasing cytokines such as interleukin (IL)-12 [12].

Binding of IFN- γ to its receptor induces transphosphorylation of the receptor-associated Janus kinase (Jak)-1 and Jak2. The activated Jaks phosphorylate the intracellular domain of the IFN- γ receptor (IFNGR), which serves as a docking site for Stat1. Stat1 is phosphorylated at tyrosine 701 (Tyr 701) by Jak2. Phosphorylated Stat1 then forms a homodimer, translocates to the nucleus and regulates gene expression by binding to gamma-activated sequence (GAS) elements in the promoters of IFN- γ -regulated genes. In response to IFN- γ , IFNGR activates other kinases in a Stat1-independent manner, including mitogen-activated protein (MAP)-kinases such as c-jun N-terminal kinase (JNK), phosphatidylinositol 3-kinase-AKT, Pyk2 and extracellular-signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) [13,14]. These kinases, which are also integrated in macrophage Toll-like receptor (TLR) signalling pathways, have important physiological consequences during *M. tuberculosis* infection [15,16].

Examining the immune response in patients with active tuberculosis has confirmed that IFN- γ is compartmentalized in infected lungs as well as in lymph nodes [17–23]. Therefore, the basis for the failure to control *M. tuberculosis* despite the action of IFN- γ remains unknown. The present study aimed to evaluate the phenotype and signalling cascades of IFN- γ -stimulated macrophages from patients with active tuberculosis and healthy individuals.

Materials and methods

Patients and control subjects

A total of 14 tuberculosis patients (TBP), 15 infected but healthy household contacts (HHC) and 14 naive controls from the community (CC) were recruited for the donation of whole blood to isolate and culture monocytes. Pulmonary tuberculosis was diagnosed in all TBP by acid-fast screening of a sputum smear, by being *M. tuberculosis* culture-positive and by chest radiography. Additionally, they all reacted within 72 h to an intradermal injection of 5 tuberculin units of purified protein derivative from *M. tuberculosis* with an average induration size above 17 mm in diameter (tuberculin-positive; PPD⁺). None of the donors had a previous history of tuberculosis, nor were they under anti-tuberculosis chemotherapy for longer than 1 week. Latently infected healthy household contacts (HHC) [19] were people who lived with a tuberculosis patient for more than 5 months, had both acid-fast sputum smear and *M. tuberculosis* culture negatives and were PPD⁺. Naive controls (CC) were people who had no known contact with any tuberculosis patients and were tuberculin-negative (<5 mm induration size; PPD⁻) by testing twice with an interval of a month. Subjects with any chronic or immunosuppressive disease [human immunodeficiency virus/acquired immune deficiency syndrome (HIV/AIDS), vascular hypertension, diabetes, hepatitis, asthma] or taking immunosuppressive medication (corticosteroids) were excluded. The median age

was 41 years (range 19–50) for the TBP group, 37 years (range 23–50) for the HHC group and 27 years (range 23–34) for the CC group. All subjects provided informed consent from protocols approved by the institutional review boards of the National Institute of Respiratory Diseases (INER) and National Autonomous University of Mexico (UNAM).

Culture of human monocyte-derived macrophages and IFN- γ stimulation

PBMCs obtained from the whole venous blood of each donor were layered over Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and centrifuged for 25 min at 1200 g at room temperature. After washing four times with phosphate-buffered saline (PBS) containing 10% autologous plasma, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were incubated at 37°C in RPMI-1640 culture medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) in 100 mm plastic Petri dishes. After 3 h the non-adherent cells were washed with four changes of warmed RPMI-1640 medium. Adherent cells were >95% monocytes as determined by flow cytometry with anti-CD14 [phycoerythrin (PE)-conjugated] and anti-CD11b (Alexa 488-conjugated) antibodies (Beckton Dickinson, San Diego, CA, USA). Human monocyte-derived macrophages (referred to hereafter as macrophages) were prepared by culturing monocytes at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere for 7 days in the presence of 20% FBS plus 2% human AB pooled serum. Once differentiated, macrophages were stimulated to induce cell size enlargement, membrane protrusions and nitric oxide production by treating cells for 22 h in serum-free RPMI-1640 medium containing human recombinant IFN- γ (500 U/ml; Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA). Macrophages were certified as uninfected prior to our experiments based on three assays: (i) inspection of adherent monocyte-derived macrophages of each subject by viewing 100 microscope fields after auramine–rhodamine staining, (ii) plating serial dilutions of cell lysates onto Middlebrook 7H10 agar and (iii) polymerase chain reaction (PCR) and DNA-hybridization of the CFP-10 gene of *M. tuberculosis* (sensitivity limit of 5 fg of genomic DNA) in DNA extracts of 1×10^6 macrophages.

Measurement of mycobactericidal response of human macrophages

Our protocol was adopted from a previous study by Wong *et al.* [24]. We quantified the *M. tuberculosis* growth index in human macrophages. Briefly, we used live virulent *M. tuberculosis* H37Rv strain (ATCC 25618) grown to mid-log phase in Middlebrook 7H9 broth (Difco, Detroit, MI, USA) supplemented with 10% ADC (albumin, dextrose, catalase; Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA) and 0.05% Tween 80 (Sigma, St Louis, MO, USA). Bacteria were washed and

suspended in RPMI-1640 medium. Suspensions of mycobacteria were sonicated to disperse clumps as described previously [25] and were added to triplicate batches of adherent human macrophages at a multiplicity of infection (MOI) of 10 viable bacilli [colony-forming units (CFU)]. After 4 h of incubation, cells were washed three times with pre-warmed PBS to remove extracellular bacteria. This was considered time 0. At times 0 and 48 h, infected macrophages were lysed by incubating with PBS containing 0.1% Tween 20 for 10 min followed by pipetting. The organisms were then processed for the CFU assay as described previously [25]. Serial 10-fold dilutions of the bacterial suspension were made and plated on Middlebrook 7H10 agar plates supplemented with 10% of OADC (ADC plus oleic acid). After 21 days, dilutions containing 10–200 colonies, each arising from a single mycobacterium, were counted. As a control, equal inocula of mycobacteria were added to wells without macrophages and cultured under the same conditions as infected macrophages. The growth index was defined as the number of CFU at 48 h of culture with macrophages divided by the number of CFU at 0 h of culture with macrophages. A growth index greater than 1 indicated that the strain multiplied inside human macrophages, whereas a growth index of less than 1 indicated that the bacteria were engulfed and gradually killed by macrophages [24].

Measurement of cytokines and nitric oxide

Supernatants from triplicate cultures of macrophages were collected at 48 h post-infection. All supernatants were immediately snap-frozen at -70°C before being tested. Cytokine assays were performed for IL-10, IL-12p70, tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and transforming growth factor (TGF)- β using a kit according to the manufacturer's instructions (DuoSet ELISA development system; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA). Nitrite levels, as a stable product of NO, were determined by the Griess assay as published elsewhere [26]. The amount of NO was calculated from a standard curve of NaNO_2 .

Preparation of nuclear and cytoplasmic extracts

Macrophage monolayers were washed and incubated for 10 min with ice-cold PBS, scraped into PBS with 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and pelleted by centrifugation (500 g) at 4°C for 10 min. Cell pellets were resuspended in buffer A (20 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 1 mM ethyleneglycol tetraacetic acid (EGTA), 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM NaF, 1 mM PMSF, 20 mg/ml aprotinin, 20 mg/ml antipain, 20 mg/ml leupeptin and 10 mg/ml pepstatin A) and incubated on ice for 10 min. Nonidet P-40 was added to a final concentration of 0.2% and the cell suspension was passed through a 26-gauge needle to break open the cells. After centrifugation (12 000 g, in a microcentrifuge) at

4°C for 1 min, supernatants were collected as cytoplasmic extracts, and the pellets (crude nuclei) were resuspended in buffer B (20 mM HEPES, pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM NaF and the same protease inhibitors as in buffer A). After incubating for 60 min on ice, insoluble materials were pelleted by centrifugation (15 000 g) at 4°C for 10 min and supernatants were collected as nuclear extracts.

Western blot and electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Western blots using cytoplasmic and nuclear lysates, and EMSAs with nuclear lysates were performed to determine signal activation. Cells treated with 500 U/ml of IFN- γ for 45 min were processed for cytoplasmic and nuclear extraction as mentioned above. Equal amounts of protein samples were run on a 10% sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel in reducing conditions followed by transfer onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. The blots were blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (TBS) with 0.1% Tween 20. Western blots were then probed with antibodies recognizing phosphorylated forms of Stat1 (Tyr701) (1/200; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA), AKT (1/1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) and c-Jun (Cell Signaling Technology; 1/1000). The secondary antibodies used were horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse (1/10 000; Jackson, West Grove, PA, USA) or anti-rabbit (1/5000; Zymed, San Francisco, CA, USA) and were detected by using the Immobilon Western system (Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were subsequently stripped (100 mM β -mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl; at 50°C for 30 min) and reprobed with antibodies that bound non-phosphorylated forms of Stat1, AKT and c-Jun (all at 1/200; all from Santa Cruz Biotechnologies). EMSA was performed with 10 μg of nuclear protein incubated with a ^{32}P -end-labelled double-stranded DNA oligonucleotide (5'-CATG TTATGCATATTCCTGTAAGTG-3'; underlining indicates GAS binding site for Stat1; Santa Cruz Biotechnology). Binding reactions were performed for 10 min at room temperature in 1 \times binding buffer (50 mM Tris-HCl, 20% glycerol, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 2.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF), with 1 μg of poly(dI-dC) and 50- or 100-fold molar excess unlabelled competitor or Supershift antibodies for Stat1 and phospho-Stat1 (Tyr 701) (1 μl ; Santa Cruz Biotechnology) when needed. Protein complexes were separated from the free probe by electrophoresis in native 5% polyacrylamide gels prepared with 0.5 \times Tris-borate-EDTA (TBE) buffer and radiographed on X-ray film.

Statistical analysis

Data were analysed by Wilcoxon signed-rank test for paired comparisons (resting *versus* activated), and Kruskal-Wallis

test for differences between groups using SPSS software (version 10).

Results

Mycobacterium tuberculosis survives well in IFN- γ -stimulated macrophages of patients with active tuberculosis

We observed a higher number of *M. tuberculosis* H37Rv CFUs in macrophages of patients with active tuberculosis (TBP) with and without prior IFN- γ stimulus both immediately after removal of non-phagocytosed bacteria (Fig. 1a), and after 48 h of growth than *M. tuberculosis* CFUs obtained of macrophages from healthy subjects (Fig. 1b). Even though TBP macrophages had more mycobacterial binding and phagocytic activity, they were unable to control mycobacterial growth when compared to macrophages from healthy subjects, as indicated by the marked difference in mycobacterial load reduction by these cells pretreated with IFN- γ ($P < 0.005$, Wilcoxon signed-rank test; Fig. 1c). Indeed, in some cases *M. tuberculosis* grew better in IFN- γ -stimulated

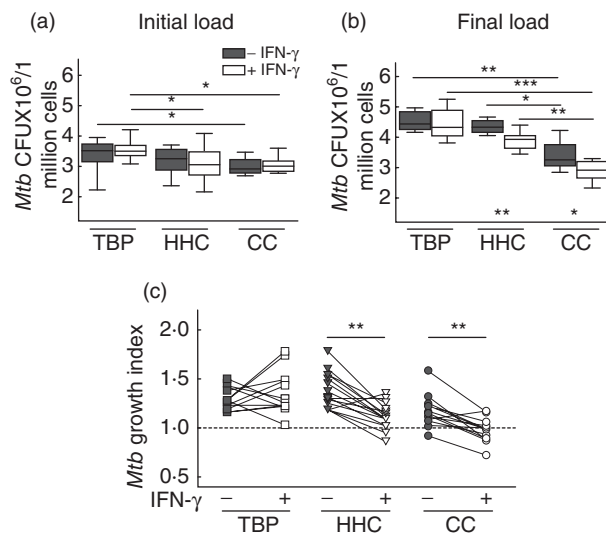


Fig. 1. Interferon (IFN)- γ allows the growth of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages of patients with active tuberculosis. Boxes of median-quartile range and whiskers of min to max were performed with the 10 viable bacilli [colony-forming units (CFU)] mean of triplicates of macrophage batches of each subject at 0 h (a) and 48 h (b) post-infection and grouped in tuberculosis patients (TBP, $n = 14$), healthy household contacts (HHC, $n = 15$) and healthy uninfected community controls (CC, $n = 14$). Significant differences are at $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$ with Wilcoxon signed-rank test for comparisons within groups and with Kruskal–Wallis test for comparisons between groups. *M. tuberculosis* growth index (c) is expressed as the fold change over time of bacterial growth in macrophages cultured in media alone (solid symbols) or with IFN- γ (empty symbols) and was calculated by dividing mean CFU at 48 h (final load) by mean CFU at 0 h (initial load) for each donor.

TBP macrophages (Fig. 1c). These results suggest that IFN- γ treatment in TBP macrophages did not induce the mycobactericidal mechanisms which presumably occurred in macrophages of healthy infected (HHC) and uninfected (CC) people. Interestingly, IFN- γ -induced inhibition of mycobacterial growth was more marked in macrophages of subjects who were naive to infection (CC) ($P < 0.001$, Kruskal–Wallis test).

IFN- γ induced low bactericidal mechanisms and a dominant anti-inflammatory profile in macrophages of TB patients

NO, which is produced from L-arginine in a reaction catalyzed by inducible NO synthase (iNOS) in macrophages, is an IFN- γ induced endogenous free radical that mediates mycobacterial killing, inflammation and cell signalling which, together with cytokines such as IL-12p70 and TNF- α , participates in the control and apparent inactivation of *M. tuberculosis*. We observed that continuous stimulus with IFN- γ (500 U/ml for 22 h) induced macrophages of the TBP group to produce low levels of NO and IL-12p70, but high levels of TNF- α and IL-10 at 48 h after IFN- γ removal. This is contrary to what was observed for both healthy infected (HHC) and uninfected (CC) groups, where macrophages responded to IFN- γ by producing higher levels of NO, IL-12p70 and TGF- β and low levels of IL-10 and TNF- α (Fig. 2). Interestingly, *M. tuberculosis* infection alone induced TBP cells to produce more IL-10 and TGF- β than macrophages of healthy subjects. However, *M. tuberculosis* did not alter the overall responsiveness to IFN- γ because NO and cytokines were produced similarly in IFN- γ -prestimulated macrophages of all groups after *M. tuberculosis* infection. This reflects the macrophage bactericidal responsiveness to IFN- γ of each group; the more NO produced, the greater the inhibition of *M. tuberculosis* growth by macrophages.

IFN- γ signalling is down-regulated in macrophages from TB patients

Because we observed that TBP macrophages respond to IFN- γ in an opposite manner to HHC and CC macrophages, we analysed their Stat1-dependent and -independent signalling pathways. Once it was shown that Stat1 signalling is activated rapidly in an IFN- γ -dependent manner (Fig. 3a and b), we observed at the half of its signalling intensity (45 min of exposure to IFN- γ) (Fig. 3c) that there were no disruptions of such signal pathway in TBP macrophages, nor were there any differences in DNA-binding ability of Stat1 within the groups. These data indicate that the different functionalities of those cells were independent of the ability of Stat1 to translocate to the host cell nucleus and bind to the consensus DNA sequence (GAS). Therefore, to determine the role of IFN- γ induced Stat1-dependent and

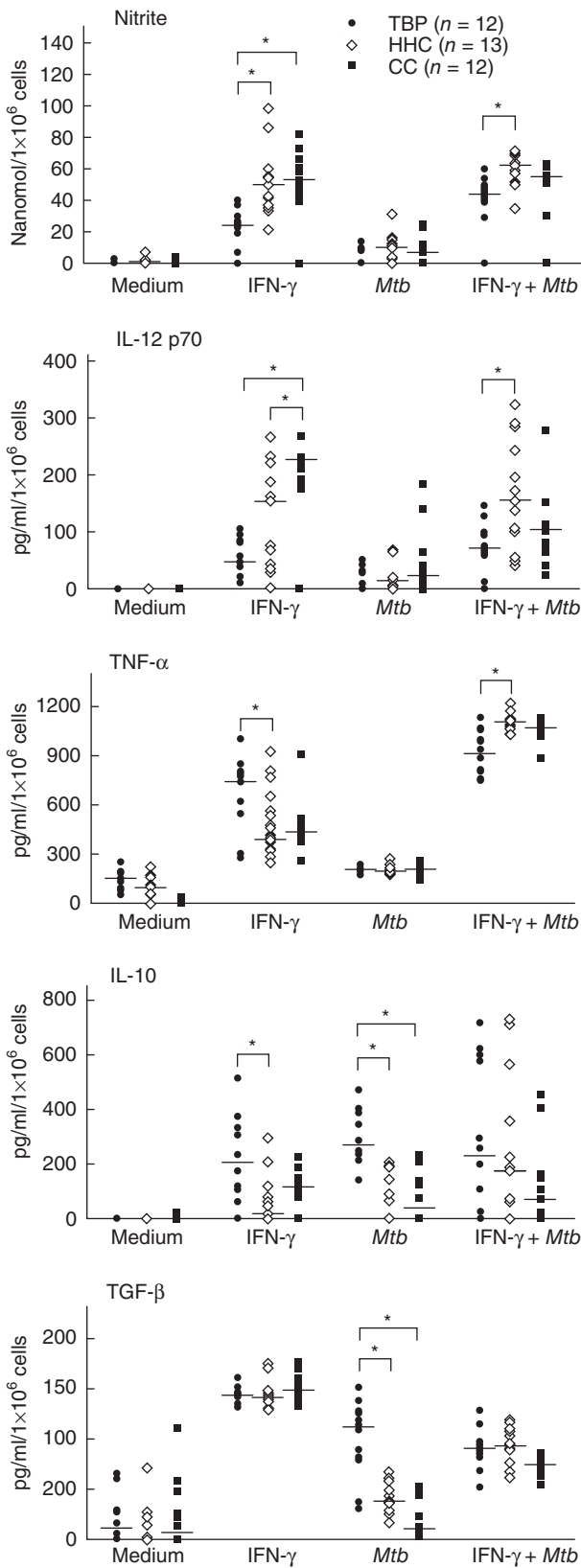


Fig. 2. Anti-inflammatory response to interferon (IFN)- γ and *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages of patients with active tuberculosis. Plots are the mean of two replicate values of two independent experiments of each subject. Lanes at median values of each group. * $p < 0.05$ with the Kruskal–Wallis test.

-independent signalling events in the phenotype of these macrophages, we analysed the intensity of activation of Stat1, AKT and c-Jun by Western blotting for phosphorylated proteins in cytoplasmic and nuclear extracts. As shown in Fig. 4, Stat1 and c-Jun are activated concomitantly by IFN- γ with low and prominent strength in TBP and HHC macrophages, respectively, whereas in CC macrophages both proteins are activated dissimilarly. The AKT activation was relatively similar between groups, confirming that macrophage-specific signalling pathways are regulated differentially in relation to donor status.

Discussion

The data presented here show that IFN- γ and *M. tuberculosis* stimuli induce a different response on human monocyte-derived macrophages of patients with active tuberculosis than is induced on macrophages from healthy but *M. tuberculosis*-infected (HHC) or uninfected (CC) human controls. The comparisons between patients and controls were focused upon three points: the capability of their macrophages to limit the growth of the pathogen, their cytokine response at early evaluation times and the intensity of intracellular signals activated by IFN- γ .

Macrophages and IFN- γ -producing lymphocytes are considered the main effectors of the protective immune response against tuberculosis. These cells respond by containing mycobacteria in granulomatous lesions, resulting in a lack of clinical symptoms, otherwise known as latency [4]. However, in less than 10% of infected individuals, *M. tuberculosis* infection progresses to active disease in the face of a prominent TH1 immune response with the presence of IFN- γ , indicating a deficiency in cell responsiveness to IFN- γ .

Because IFN- γ augments the bactericidal function of macrophages by stimulating the synthesis of reactive oxygen intermediates and nitric oxide, the level of intracellular mycobacterial growth has been correlated with the intensity of the immune response under physiological conditions [25]. In our study, treatment with IFN- γ led rapidly to a decrease in growth of *M. tuberculosis* in macrophages from both control groups but not in TBP macrophages (Fig. 1). This effect was not due to phagocytosis, because IFN- γ treatment did not reduce the number of phagocytosed bacteria. However, phagocytic activity was different between groups. Macrophages of uninfected subjects (CC) with or without IFN- γ treatment phagocytosed fewer mycobacteria than TBP, but not HHC macrophages. TBP and HHC macrophages showed differences in phagocytosis only with IFN- γ

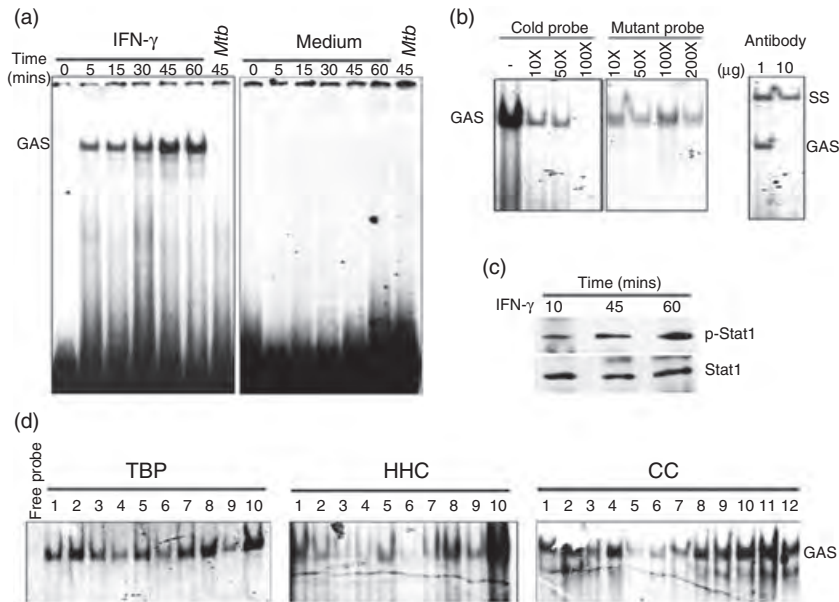


Fig. 3. Stat1-dependent interferon (IFN)- γ signalling is accomplished in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages of patients with active tuberculosis (TB) as healthy normal subjects. Ten micrograms of nuclear extracts were incubated with 32 P-labelled DNA probe containing the gamma interferon activating sequence (GAS) and then assayed for electrophoretic mobility shift assay (EMSA) (a). Stat1-GAS specific binding was corroborated by competing with the same unlabelled probe (cold probe) or with a probe mutated for GAS site (mutant probe) or by using an anti-Stat1 antibody to produce a supershift (SS) in EMSAs of nuclear extracts of macrophages incubated 45 min with IFN- γ (b). Stat1 phosphorylation (Tyr701) was corroborated by Western blotting of nuclear extracts (c). EMSAs were performed with 10 μ g of nuclear extracts of *M. tuberculosis*-infected macrophages (48 h) incubated for 45 min with IFN- γ in patients with active TB (TBP, $n = 10$), healthy household contacts (HHC, $n = 10$) and healthy uninfected subjects (CC, $n = 12$) (d).

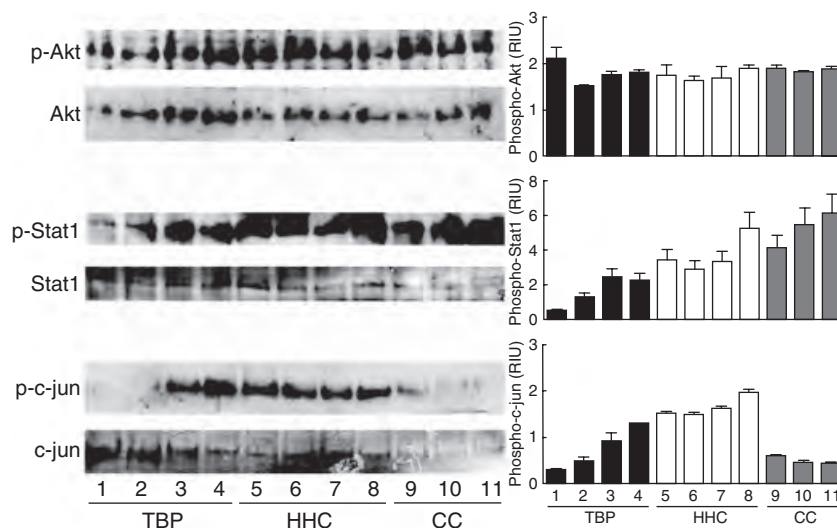


Fig. 4. Down-activation of Stat1 and c-Jun in interferon (IFN)- γ -treated macrophages from patients with active tuberculosis (TB). Uninfected macrophages of patients with active tuberculosis (TBP), healthy household contacts (HHC) and healthy uninfected subjects (CC) were incubated with IFN- γ (500 U/ml) for 45 min and processed for cytoplasmic and nuclear extraction (see Material and methods). Western blots were assayed with 10 μ g of cytoplasmic protein for phosphorylated AKT (p-Akt) (Thr308) and 10 μ g of nuclear protein for phosphorylated Stat1 (p-Stat1)(Tyr701) and phosphorylated c-Jun (p-c-jun) (Ser73). The blots were stripped and re-probed with antibodies against total AKT, Stat1 and c-Jun, respectively. Densitometry analysis was performed in blots and relative intensity units (RIU) were calculated by dividing values of phosphorylated protein in values of total protein.

treatment. Moreover, *M. tuberculosis* displayed better growth in TBP macrophages than in HHC and CC macrophages, which were more effective at controlling growth. Indeed, when treated with IFN- γ , TBP macrophages were highly permissive to *M. tuberculosis* growth, while the opposite was true for CC macrophages. These results indicate that macrophage bactericidal response to IFN- γ is reduced in subjects with active TB.

Differences in macrophage phagocytosis between patients and controls may be related to the possibility of differences in density of surface phagocytic receptors for *M. tuberculosis*, in particular of those associated with its intracellular growth permissiveness [27,28], like the TBP macrophage response shown in our study. The human mannose receptor directs mycobacterial-phagosome biogenesis [29] to *M. tuberculosis* tolerance by inhibiting ligand-induced proinflammatory effects on macrophages [30,31]. A reduction in surface density of this receptor in macrophages reduces *M. tuberculosis* intake [27], thus an increase in *M. tuberculosis* phagocytosis, as observed for TBP macrophages, suggests an increase in this receptor. Moreover, the highest levels of *M. tuberculosis*-induced IL-10 and TGF- β produced by TBP macrophages (Fig. 2) are in agreement with the possibility that differences in receptors are accounting for the differences in cell response at the ligand level [32]. Although we did not evaluate density or functionality of any phagocytic or innate immune receptor, it is an important factor that needs future attention.

The improvement of *M. tuberculosis* killing by macrophages of healthy subjects in our study disagrees with the prior notion that incubation of monocyte-derived human macrophages with IFN- γ did not improve *M. tuberculosis* killing [33,34]. Differences between these studies and our study may be related to differences in the time used to evaluate mycobactericidal activity. The reason that other studies show a slight reduction, or even an increase, in viability of *M. tuberculosis* is due to IFN- γ -induced death of *M. tuberculosis*-infected cells [7,35]. This macrophage death results in an increase in the number of free-cell mycobacteria and therefore in an increase in the MOI, as reported by themselves [33]. The increase in intracellular growth was probably caused by increasing phagocytosis rates due to the higher availability of bacteria, rather than a deficiency in controlling its growth. Moreover, in our conditions of IFN- γ with mycobacterial stimulation, cells began to detach after 3 days, affecting their functionality. Therefore we decided not to evaluate times beyond 48 h post-infection.

The mycobacterial growth control found in our study led us to examine bactericidal mechanisms used by the macrophages. Macrophages with low NO production harboured the highest mycobacterial loads, while high NO producers had the lowest counts for living mycobacteria. Concordantly, TBP macrophages are low NO producers and HHC and CC macrophages are high NO producers. These data indicate that activation or the strength of oxidative

burst in TBP macrophages is reduced compared to cells from healthy hosts. The data also indicate that there is not a lack of response to IFN- γ or impairment of its signal pathway in TBP cells, because IFN- γ treatment increased their TNF- α and IL-10 production further with significant prominence above HHC and CC macrophages (Fig. 2). This suggests a dissimilar regulation of IFN- γ response. Park *et al.* did not find any differences in the rate in which TNF- α production increased between IFN- γ -treated macrophages of patients with clinical TB and controls with clear chest radiography prior to lipopolysaccharide (LPS) stimulation [36]. However, it is difficult to determine whether or not a subtle change in the IFN- γ response in TBP macrophages is reflected in TNF- α production, because of the LPS stimulus. Moreover, the sample size of groups they used was too small to determine a functional difference.

Due to the different functional responses of macrophages observed in our study, we decided to evaluate *M. tuberculosis*-infected macrophages from all groups for their Stat1-dependent IFN- γ signal transduction pathway by means of nuclear translocation and DNA binding. We did not find substantial differences among individuals, indicating that there was no disruption of signal transduction or dysfunction of this transcription activator in TBP cells (Fig. 3). These results confirm that impairment of the IFN- γ signalling pathway does not account for cases of clinical TB. Condos *et al.* [37] showed that the refractory response to IFN- γ in alveolar macrophages from multi-drug resistance tuberculosis patients reverted with aerosol treatment of recombinant IFN- γ that induced Stat1 activation and improved the clinical course of patients. These data confirm that the IFN- γ signal transduction system is functional, and suggests that a modification in the response to IFN- γ , beyond the deleterious effects caused by *M. tuberculosis* [28,38,39], could be responsible for the development of clinical tuberculosis, while the onset and establishment of infection depends upon the nature of the pathogen.

In fact, our observations describe a non-classical response to IFN- γ in TBP macrophages. How this response to IFN- γ relates to its well-documented influence on macrophage activation, which involves functional up-regulation of several proinflammatory response genes, is not clear. One possible explanation is through the regulation of signalling pathways. Among the most important endogenous regulatory factors of signalling pathways is the signal transduction cross-talk that results in the downstream activation of pro- or anti-inflammatory genes [40]. Stat1 is considered one of the cross-talk regulators that influence the activation or repression of genes through synergism or antagonism with transcription factors belonging to other signalling pathways [41]. We found that although IFN- γ -dependent Stat1 activation was reduced in TBP macrophages (Fig. 4), this resulted in turn in less IFN- γ -dependent gene activation of IL-12 and iNOS, as suggested by the low levels of their final products (Fig. 3). This correlates the quality of the signal activation

with both the phenotype of the cell and the infection/inflammatory status of the donor. It is well documented that a sustained and strong activation of Stat1 leads to increased IFN- γ -dependent activation of genes related to *M. tuberculosis* protection [13]. Besides this, activation of other transcription factors downstream of several signalling pathways may enhance the response, inhibit it or be necessary for cells to respond fully to the essential Stat1 IFN- γ -dependent signalling [14,42]. In addition to the well known Jak2–Stat1 signalling pathway, IFN- γ activates Pyk2, PI3-K/Akt, mitogen-activated protein kinases (MAPK) including extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), p38 MAPK and c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases (JNKs/SAPKs) [14,42]. Activation of c-Jun is required for the activation of IFN- γ response genes through AP-1, but is independent of Stat1 signalling [43]. Here we present evidence that c-Jun is activated differentially through IFN- γ in macrophages of patients with active disease, and in individuals with precedent of infection but without clinical disease (HHC). Moreover, c-Jun is activated strongly in HHC cells and minimally in cells of diseased individuals and naive controls. These results show that activation of c-Jun plays a key role in regulating IFN- γ signalling in a Stat1-independent manner. Interestingly, the activation of other Stat1-independent signalling pathways such as PI3-K/AKT are similar between groups, indicating that functional modification involves only particular signalling pathways, and reinforcing the notion that a regulatory mechanism is related to a precedent of infection. Under physiological circumstances (no tuberculosis infection or disease), the mechanism of action of IFN- γ on the macrophage results in IL-10 gene down-regulation by GSK3 activation which, in turn, contributes to the inhibition of AP-1–DNA binding by reducing AP-1 expression [44]. The elevated production of IL-10 together with the diminished c-Jun activation induced by IFN- γ suggests that this mechanism is altered in TBP macrophages.

Our results provide evidence that dysfunction of macrophages in response to IFN- γ is dependent not only on the Stat1 signalling pathway, but on AP-1 activation. There has not been a reported dysfunction of c-Jun proteins, referred to as gene mutations or polymorphisms, associated with susceptibility to mycobacterial diseases [45]. However, alterations in the regulation of AP-1 proteins (c-jun/c-fos) are well described in human pathologies of chronic inflammation, resulting in modification of macrophage functionality in response to inflammatory stimulus or cytokines [46]. Macrophage heterogeneity has been altered in chronic inflammatory diseases such as asthma, organ tissue fibrosis, arthritis, obesity and even in granulomatous diseases [47–49]. As a result of loss of equilibrium in host mechanisms of inflammation, macrophages could be polarized into functional populations that respond differently to the same stimulus. Polarized human macrophage phenotypes have been described previously and are named M1 and M2

macrophages [by transposition of T helper type 1 (Th1) and Th2 phenotypes]. M1 and M2 populations are derived by culturing with granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (GM–CSF) or M-CSF and produce mainly IL-12 or IL-10, respectively [50]. Such phenotypes are preserved even after their activation with different stimulus: LPS, zymosan, IFN- γ or CD40L. Macrophage polarization has been identified previously in human populations by defining monocyte subsets through cell surface markers with specific differential properties observed *in vitro* as well as *in vivo* [51,52]. Such macrophage polarization could be present in individuals with active tuberculosis, thus affecting the response of cells to a protective signal such as IFN- γ . Our results show a non-classical IFN- γ -response in monocyte-derived macrophages from TB patients, derived from an altered regulatory mechanism in Stat1-independent and -dependent signalling pathways. Whether this is the reason for tuberculosis susceptibility or is a consequence of it still remains unknown.

Acknowledgements

We thank Gabriel Jesús Moreno González and Gabriela Rodríguez Rodríguez for technical assistance with EMSA. Also we thank Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas. This work was funded by grant DGAPA PAPIIT-IN225506 and -IN209708 from the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Doctoral scholarship grant CONACyT-158472 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico; and the Programa Transdisciplinario en Investigación y Desarrollo para Facultades y Escuelas del Macroproyecto 'Nuevas Estrategias Epidemiológicas, Genómicas y Proteómicas en Salud Pública UNAMSDEI.PTID.05-04.

Disclosure

The authors do not have any conflict of interests to declare.

References

1. Raviglione MC. The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis* (Edinb) 2003; **83**:4–14.
2. Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol* 2001; **1**:20–30.
3. Bhatt K, Salgame P. Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol J Clin* 2007; **27**:347–62.
4. Ulrichs T, Kosmiadi GA, Jorg S *et al.* Differential organization of the local immune response in patients with active cavitary tuberculosis or with nonprogressive tuberculoma. *J Infect Dis* 2005; **192**:89–97.
5. 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* 2006; **173**:238–45.

6. Kaufmann SH. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis* 2002; **61** (Suppl. 2):ii54–8.
7. Bonecini-Almeida MG, Chitale S, Boutsikakis I *et al.* Induction of *in vitro* human macrophage anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity: requirement for IFN- γ and primed lymphocytes. *J Immunol* 1998; **160**:4490–9.
8. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to infection. *J Exp Med* 1993; **178**:2249–54.
9. Dorman SE, Picard C, Lammas D *et al.* Clinical features of dominant and recessive interferon gamma receptor 1 deficiencies. *Lancet* 2004; **364**:2113–21.
10. Macmicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**:5243–8.
11. 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.
12. Zissel G, Ernst M, Schlaak M, Muller-Quernheim J. Pharmacological modulation of the IFN γ -induced accessory function of alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Inflamm Res* 1999; **48**:662–8.
13. Hu X, Herrero C, Li WP *et al.* Sensitization of IFN- γ Jak-STAT signaling during macrophage activation. *Nat Immunol* 2002; **3**:859–66.
14. Ramana CV, Gil MP, Schreiber RD, Stark GR. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN- γ -dependent signaling. *Trends Immunol* 2002; **23**:96–101.
15. Yang CS, Lee JS, Song CH *et al.* Protein kinase C zeta plays an essential role for *Mycobacterium tuberculosis*-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes/macrophages via Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol* 2007; **9**:382–96.
16. Yang CS, Shin DM, Lee HM *et al.* ASK1-p38 MAPK-p47phox activation is essential for inflammatory responses during tuberculosis via TLR2-ROS signalling. *Cell Microbiol* 2008; **10**:741–54.
17. Barnes PF, Fong SJ, Brennan PJ, Twomey PE, Mazumder A, Modlin RL. Local production of tumor necrosis factor and IFN- γ in tuberculous pleuritis. *J Immunol* 1990; **145**:149–54.
18. Bai X, Wilson SE, Chmura K, Feldman NE, Chan ED. Morphometric analysis of Th(1) and Th(2) cytokine expression in human pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2004; **84**:375–85.
19. Schwander SK, Torres M, Carranza CC *et al.* Pulmonary mononuclear cell responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in healthy household contacts of patients with active tuberculosis and healthy controls from the community. *J Immunol* 2000; **165**:1479–85.
20. Ribera E, Ocana I, Martinez-Vazquez JM, Rossell M, Espanol T, Ruibal A. High level of interferon gamma in tuberculous pleural effusion. *Chest* 1988; **93**:308–11.
21. Lin Y, Zhang M, Hofman FM, Gong J, Barnes PF. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect Immun* 1996; **64**:1351–6.
22. Robinson DS, Ying S, Taylor IK *et al.* Evidence for a Th1-like bronchoalveolar T-cell subset and predominance of interferon-gamma gene activation in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; **149**:989–93.
23. Barnes PF, Lu S, Abrams JS, Wang E, Yamamura M, Modlin RL. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect Immun* 1993; **61**:3482–9.
24. Wong KC, Leong WM, Law HK *et al.* Molecular characterization of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and their association with phenotypic virulence in human macrophages. *Clin Vaccine Immunol* 2007; **14**:1279–84.
25. Laochumroonvorapong P, Paul S, Manca C, Freedman VH, Kaplan G. Mycobacterial growth and sensitivity to H₂O₂ killing in human monocytes *in vitro*. *Infect Immun* 1997; **65**:4850–7.
26. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; **126**:131–8.
27. Schlesinger LS. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol* 1993; **150**:2920–30.
28. Banaiee N, Kincaid EZ, Buchwald U, Jacobs WR Jr, Ernst JD. Potent inhibition of macrophage responses to IFN- γ by live virulent *Mycobacterium tuberculosis* is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2. *J Immunol* 2006; **176**:3019–27.
29. Kang PB, Azad AK, Torrelles JB *et al.* The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med* 2005; **202**:987–99.
30. Kang BK, Schlesinger LS. Characterization of mannose receptor-dependent phagocytosis mediated by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. *Infect Immun* 1998; **66**:2769–77.
31. Nadesalingam J, Dodds AW, Reid KB, Palaniyar N. Mannose-binding lectin recognizes peptidoglycan via the N-acetyl glucosamine moiety, and inhibits ligand-induced proinflammatory effect and promotes chemokine production by macrophages. *J Immunol* 2005; **175**:1785–94.
32. Chang JS, Huggett JF, Dheda K, Kim LU, Zumla A, Rook GA. *Mycobacterium tuberculosis* induces selective up-regulation of TLRs in the mononuclear leukocytes of patients with active pulmonary tuberculosis. *J Immunol* 2006; **176**:3010–18.
33. Douvas GS, Looker DL, Vatter AE, Crowle AJ. Gamma interferon activates human macrophages to become tumoricidal and leishmanicidal but enhances replication of macrophage-associated mycobacteria. *Infect Immun* 1985; **50**:1–8.
34. Rook GA, Steele J, Ainsworth M, Champion BR. Activation of macrophages to inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of the effects of recombinant gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. *Immunology* 1986; **59**:333–8.
35. Placido R, Mancino G, Amendola A *et al.* Apoptosis of human monocytes/macrophages in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Pathol* 1997; **181**:31–8.
36. Park GY, Im YH, Ahn CH *et al.* Functional and genetic assessment of IFN- γ receptor in patients with clinical tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; **8**:1221–7.
37. Condos R, Raju B, Canova A *et al.* Recombinant gamma interferon stimulates signal transduction and gene expression in alveolar macrophages *in vitro* and in tuberculosis patients. *Infect Immun* 2003; **71**:2058–64.
38. Fortune SM, Solache A, Jaeger A *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* inhibits macrophage responses to IFN- γ through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 2004; **172**:6272–80.
39. Ting LM, Kim AC, Cattamanchi A, Ernst JD. *Mycobacterium*

- tuberculosis* inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *J Immunol* 1999; **163**:3898–906.
40. Hu X, Chen J, Wang L, Ivashkiv LB. Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2007; **82**:237–43.
 41. Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark GR. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene* 2000; **19**:2619–27.
 42. Ramana CV, Gil MP, Han Y, Ransohoff RM, Schreiber RD, Stark GR. Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**:6674–9.
 43. Gough DJ, Sabapathy K, Ko EY *et al.* A novel c-Jun-dependent signal transduction pathway necessary for the transcriptional activation of interferon gamma response genes. *J Biol Chem* 2007; **282**:938–46.
 44. Hu X, Paik PK, Chen J *et al.* IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* 2006; **24**:563–74.
 45. Fortin A, Abel L, Casanova JL, Gros P. Host genetics of mycobacterial diseases in mice and men: forward genetic studies of BCG-osis and tuberculosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007; **8**:163–92.
 46. Wagner EF, Eferl R. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev* 2005; **208**:126–40.
 47. Gil A, Maria AC, Gil-Campos M, Canete R. Altered signalling and gene expression associated with the immune system and the inflammatory response in obesity. *Br J Nutr* 2007; **98** (Suppl. 1):S121–6.
 48. Kawanaka N, Yamamura M, Aita T *et al.* CD14+, CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; **46**:2578–86.
 49. Scherberich JE, Nockher WA. CD14++ monocytes, CD14+/CD16+ subset and soluble CD14 as biological markers of inflammatory systemic diseases and monitoring immunosuppressive therapy. *Clin Chem Lab Med* 1999; **37**:209–13.
 50. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der ZL, Ottenhoff TH. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol* 2006; **79**:285–93.
 51. Moreno-Altamirano MM, Aguilar-Carmona I, Sanchez-Garcia FJ. Expression of GM1, a marker of lipid rafts, defines two subsets of human monocytes with differential endocytic capacity and lipopolysaccharide responsiveness. *Immunology* 2007; **120**:536–43.
 52. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 1989; **74**:2527–34.