

Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Volumen
Volume 14

Número
Number 2

Abril-Junio
April-June 2001

Artículo:

Respuesta inmune a la infección por
Mycobacterium tuberculosis. Una
revisión de la literatura.

Derechos reservados, Copyright © 2001:
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Medigraphic.com

Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión de la literatura

Ma. Cecilia Eugenia García-Sancho Figueroa*

Palabras clave: Infección por *M. Tuberculosis*, respuesta inmune protectora, linfocitos T, mecanismos patogénicos.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis* infection, protective immune responses, T lymphocytes, pathogenic mechanisms.

INTRODUCCIÓN

El resurgimiento de la tuberculosis en todo el mundo, ha intensificado la investigación para examinar la defensa del huésped y los mecanismos patogénicos que operan en la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Hasta ahora, no existen métodos confiables para detectar una infección latente y aún en pacientes con tuberculosis activa puede no estar confirmada la infección¹.

En la siguiente revisión se analiza el conocimiento actual de la respuesta del huésped a la infección, haciendo énfasis en el papel de los macrófagos, las células T, la red de citoquinas y quimioquinas con relación a una respuesta inmune protectora. Se describen los mecanismos mediante los cuales *M. tuberculosis* es capaz de evitar o sobrevivir a los mecanismos de defensa del huésped. A continuación, se discuten los estudios que recientemente han buscado correlatos de respuesta inmune protectora en sujetos sanos, lo que es indispensable para tratar de establecer el diagnóstico de infección tuberculosa y en un futuro, medidas de eficacia.

RESPUESTA INMUNE A *M. tuberculosis*

La historia natural de la tuberculosis es compleja. La infección primaria ocurre en personas sin inmunidad específica, generalmente niños sanos y adultos jóvenes quienes no habían estado anteriormente expuestos a *M. tuberculosis*. La adolescencia es la edad de mayor riesgo. La enfermedad primaria se desarrolla dentro de los primeros cinco años de la infección inicial, la cual estimula inmunidad específica, demostrada por el surgimiento de una respuesta cutánea positiva al derivado proteico purificado de tuberculina. Aunque los síntomas de enfermedad primaria pueden ser pocos, la detección temprana y el tratamiento son importantes para prevenir el desarrollo de complicaciones inmediatas, las cuales pueden resultar en un elevado riesgo de morbilidad y, para prevenir también la diseminación de la infección posterior a la reactivación de la enfermedad. Con el avance en el conocimiento de la respuesta inmune a la infección primaria, aumenta también la probabilidad de tener vacunas en el futuro².

La habilidad de *M. tuberculosis* para mantener una infección crónica y causar enfermedad en un subgrupo de aquellos sujetos infectados, depende de sus productos —factores de virulencia— que capacitan al microorganismo para entrar y sobrevivir indefinidamente dentro de las células fagocíticas mononucleares por subvertir los mecanismos celulares antimicrobianos³.

La respuesta a la infección por micobacterias es el ejemplo clásico de una respuesta inmune mediada por células a un parásito intracelular facultativo⁴.

Las micobacterias, dentro de las células fagocíticas, son capaces de evadir la respuesta humorar y mantener viabilidad por largos períodos de tiempo. Las células T toman parte en la activación y regulación de los macrófagos y, subsecuentemente en el control del crecimiento mico-

* Jefa del Departamento de Epidemiología de Campo de Enfermedades Infecciosas, INER.

Correspondencia:

Dra. Ma. Cecilia Eugenia García-Sancho Figueroa, Jefa del Departamento de Epidemiología de Campo de Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Calzada de Tlalpan 4502, colonia Sección XVI, México, D. F., 14080.

E-mail:cegarsan@netscape.net

Trabajo recibido: 19-VI-2001; Aceptado: 29-VI- 2001

bacteriano. La respuesta TH1 que constituye la respuesta inmune protectora a *M. tuberculosis*, se encuentra controlada por interleuquina-1 e interleuquina-12, mediada por células T CD4 secretando interleuquina-2 e interferón gamma-interferón (IFN- γ), probablemente, algunas células T CD4 se diferencien y conviertan en células T de memoria de larga vida, expresando un fenotipo de memoria.

En la inmunidad antimicobacteriana están implicados diferentes grupos de células T incluyendo las células T CD4 alfa/beta, las células T CD8 alfa/beta y las células T gamma/delta. Ambos, los fagocitos y los microorganismos sintetizan proteínas con el fin de facilitar su sobrevida⁵. Los datos recientes muestran una fuerte correlación entre la producción de gamma interferón (TNF- α) en las células T gamma/delta y la manifestación de tuberculosis pulmonar primaria, lo cual es consistente con la hipótesis de que estas células tienen un efecto inmune protector en la infección⁶.

Las células T CD8, han mostrado ser protectoras en contra de *M. tuberculosis* en el ratón. Los datos obtenidos por experimentación sugieren que el modo primario de acción de estas células es la secreción de citoquinas, más que una actividad lítica directa de las células CD8⁷. Su acción es prolongar la sobrevida del huésped infectado.

La respuesta inmune controla, pero no elimina al patógeno. La falta de una respuesta inmune apropiada da como resultado una tuberculosis aguda activa. En la mayoría de los casos de infección por *M. tuberculosis*, el individuo permanece asintomático y no infeccioso. Esta latencia clínica a menudo se extiende durante toda la vida del individuo. Sin embargo, la reactivación de la infección latente puede ocurrir en respuesta a perturbaciones de la respuesta inmune, produciendo enfermedad activa. La infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la diabetes mellitus, el tratamiento con corticosteroides, el envejecimiento y el abuso de drogas u alcohol, aumentan el riesgo potencial de reactivación de enfermedad latente.

M. tuberculosis persiste en los macrófagos dentro de un granuloma en los huéspedes infectados. El granuloma consiste en macrófagos y células gigantes, células T, células B y fibroblastos. En las infecciones latentes, se desconoce el estado de actividad de la bacteria dentro del granuloma o tubérculo. El microorganismo puede estar en un estado inactivo sin replicarse, replicándose activamente pero limitado por la respuesta inmune, o metabólicamente alterado con ciclos replicativos infrecuentes o limitados. La alteración de la respuesta inmune puede resultar en la reactivación y replicación del bacilo, con necrosis y daño al tejido pulmonar. La respuesta inmune es capaz de prevenir la enfermedad activa en la mayoría de las personas, pero no elimina la infección. El microorganismo ha desarrollado mecanismos para evadir la respuesta inmune mediada por células. Una de las estrategias en la generación de vacunas es poder incrementar la respuesta inmune natural producida por *M. tuberculosis*.

Funciones antimicobacterianas efectoras de los macrófagos

La siguiente revisión está basada en la realizada por Flynn y colaboradores⁸. Ahora, se discutirá la información que se

ha generado sobre los mecanismos bajo los cuales las células eliminan o inactivan patógenos.

Los fagocitos mononucleares constituyen un componente antimicobacteriano muy potente de la inmunidad mediada por células.

Fusión fagolisosomal

El lisosoma es un organelo vacuolar complejo de la vía endocítica tardía. Dentro del lisosoma existen enzimas hidrolíticas potentes capaces de degradar todo un rango de macromoléculas, incluyendo microbios. Estas enzimas actúan óptimamente en un pH ácido, a condición de encontrarse dentro de un medio intralisosomal. El lisosoma es, de hecho, el órgano más ácido en las células animales, siendo su pH de 4.5-5.0. Este medio ácido es mantenido por la bomba de protones dependiente de ATP, las H⁺-ATP-atas vacuolares^{9,10}.

Por su capacidad de producir cantidades significativas de amoníaco, el bacilo tuberculoso puede evadir el ambiente tóxico dentro de la vacuola lisosomal, inhibiendo el fagolisosoma y disminuyendo la potencia de las enzimas intralisosomales vía la alcalinización. Dos enzimas que pertenecen al metabolismo del amoníaco, la ureasa micobacteriana y la glutamino-sintetasa, han sido asociadas a la interrupción de la fusión fagolisosomal y a la sobrevida micobacteriana^{11,12}.

Mecanismos antimicobacterianos basados en radicales libres. Óxidos de nitrógeno (sintetasa de óxido nítrico)

La elevada producción de óxido nítrico (NO) por los macrófagos activados es un mecanismo antimicobacteriano potente. Estos fagocitos, bajo la activación por agentes apropiados tales como el gamma interferón y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), generan NO e intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI-relacionados) vía sintetasa de óxido nítrico (NOS2) usando L-arginina como sustrato. La actividad de estos óxidos de nitrógeno tóxicos en la defensa del huésped ha sido bien documentada, tanto *in vitro* como *in vivo*, particularmente en el sistema murino^{13,14}. En el ratón, los RNI juegan un papel protector en la infección tuberculosa aguda y crónica persistente. Se ha detectado inmunohistoquímicamente un elevado nivel de expresión de NOS2 en macrófagos obtenidos por lavado pulmonar alveolar de individuos con tuberculosis pulmonar activa. Además, se ha observado que el nivel de NO exhalado aumenta en los pacientes con tuberculosis^{15,16}.

Especies reactivas de oxígeno

El papel del oxígeno tóxico (ROI) en el control de la infección micobacteriana permanece en controversia ya que no se ha confirmado su habilidad para matar a *M. tuberculosis*¹⁷⁻¹⁹. Además, las micobacterias son capaces de evadir su efecto tóxico de diferentes maneras. Por ejemplo los componentes micobacterianos lipoarabinomanan (LAM) y el fenolicoglicolípido-I(PGL-I) son potentes destructores de los radicales de oxígeno²⁰. Asimismo, los sulfátidos micobacterianos interfieren con

el mecanismo antimicrobiano dependiente de radicales de oxígeno del macrófago.

Los receptores Toll-Like y la inmunidad innata en tuberculosis

El descubrimiento de la familia de proteínas receptores *Toll-Like* (TLR), en la respuesta inmune, ha ofrecido nueva luz sobre el vínculo entre inmunidad innata e inmunidad adaptativa. Hay evidencia que sugiere que los TLR juegan un papel importante en la activación de las células inmunes por los patógenos, incluyendo *M. tuberculosis*. Brightbill y colaboradores demostraron que la inducción de IL-12 y la actividad promotora *in vitro* de NOS2 por la lipoproteína micobacteriana 19kDa es dependiente del TLR2 humano²¹. Así, pareciera que *M. tuberculosis* puede actuar vía TLR2 y TLR4 humanos, a través de un ligamiento específico²².

Citoquinas

Interleuquina-12 (IL-12) (Macrófagos)

El control inmunológico de la infección por *M. tuberculosis* está basado en una respuesta de células T tipo 1 (TH1). La producción de IL-12 es inducida —después de la fagocitosis de *M. tuberculosis*—, por los macrófagos y células dendríticas, las cuales desarrollan una respuesta TH1 con producción de IFN- γ ^{23,24}. La importancia de IL-12, en el control de la infección por *M. tuberculosis* se puede observar en el ratón deficiente del gene-IL-12p40. Cuando estos ratones se infectan, muestran una carga bacteriana importante y una disminución del tiempo de sobrevida en relación con los ratones del grupo control. Esto probablemente se debe a una reducción sustancial en la producción de IFN- γ ²⁵. Los humanos con mutaciones en los genes IL-12p40 o en el receptor de IL-12 presentan una disminución en la producción de IFN- γ en las células T y son más susceptibles a la diseminación de BCG y a las infecciones por *M. avium*, aunque no a la de *M. tuberculosis*²⁶. Existe evidencia de que la DNA-IL-12 podría reducir sustancialmente el número de bacterias en el ratón con una infección tuberculosa crónica, sugiriendo que la inducción de esta citoquina pudiera ser un factor importante en el diseño de una vacuna antituberculosa²⁷.

Gamma-interferón (IFN- γ)

El gamma interferón (IFN- γ) es clave en el control de la infección por *M. tuberculosis*. Esta citoquina es producida por las células CD4 y CD8^{28,29} durante la infección tuberculosa y por las células citocidas naturales (NK). Recientemente, se ha reportado la producción de IFN- γ dependiente de IL-12 en los macrófagos alveolares infectados con micobacterias. El ratón deficiente en IFN- γ (knock-out, GKO) es más susceptible a *M. tuberculosis* virulentos³⁰. Los individuos con deficiencias en los genes del IFN- γ o del receptor del IFN- γ están en riesgo de padecer infecciones micobacterianas graves, incluyendo a *M. tuberculosis*. El efecto de la falta IFN- γ es el crecimiento sin control del bacilo en los órganos del ratón GKO, y aunque se forman granulomas, éstos se vuelven rápidamente necróticos. En estos ratones la activación de los macrófagos es defectuosa y la expresión de NOS2 es baja,

factores que posiblemente contribuyan en gran medida a la susceptibilidad³¹.

Aunque la producción de IFN- γ sola es insuficiente para el control de la infección por *M. tuberculosis*, se requiere de esta citoquina para tener una respuesta *protectora* a este patógeno. El IFN- γ es producido tanto por sujetos PPD positivos sanos como por enfermos. Si bien, la producción de IFN- γ puede variar mucho entre sujetos y algunos estudios sugieren que los niveles de IFN- γ están disminuidos en pacientes con tuberculosis activa^{32,33} la medición nada más de esta citoquina puede no ser un correlato confiable de respuesta inmune protectora. De hecho, un estudio reciente mostró que *M. tuberculosis* puede impedir a los macrófagos responder adecuadamente al IFN- γ . Esta capacidad de *M. tuberculosis* para limitar la activación de los macrófagos por el IFN- γ sugiere que la *cantidad* de IFN- γ producida por las células T, no es tan predictiva del resultado como lo es la *habilidad de las células para responder a esta citoquina*.

Interleuquina-4

La presencia de respuesta TH2 y de IL-4 en tuberculosis está sujeta a alguna controversia. *M. Tuberculosis*, es un potente inductor de IL-12 y por lo tanto la respuesta de IFN- γ es detectada siempre en huéspedes infectados. Sin embargo, la detección de IL-4 es variable y aunque algunos reportes indican que existen varias respuestas TH2 en la enfermedad tuberculosa³⁴, esto no ha sido demostrado.

Existe una respuesta inmune TH1 deprimida, pero sin incremento en una respuesta TH2 en células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) de pacientes tuberculosos. La elevada expresión de IFN- γ se detecta en granulomas dentro de nódulos linfáticos de pacientes con linfadenitis tuberculosa, pero sólo se ha detectado una pequeña cantidad de IL-4 mRNA³¹. Estos resultados y otros indican que al parecer en humanos no existe una respuesta TH2 aso-ciada a la tuberculosis, no obstante que se ha observado este tipo de respuesta para *L. Major*. En el ratón BALB/c, más susceptible que el ratón C57BL/6 a *M. tuberculosis*, no se produce una respuesta TH2 consistente, aún cuando su resistencia pueda estar aumentada por IL-12 exógena. No se ha observado tampoco un cambio a una respuesta TH2 en los ratones GKO o IL-12p40-deficientes infectados con *M. tuberculosis*. Estos datos sugieren que la ausencia de una respuesta TH1 a *M. tuberculosis* no necesariamente promueve una respuesta TH2, y que es la deficiencia de IFN- γ la que evita el control de la infección y no la presencia de IL-4 u otras citoquinas TH2. En un estudio de expresión de genes de citoquinas en los granulomas de pacientes con tuberculosis avanzada mediante hibridización *in situ*, IL-4 fue detectada en 3/5 pacientes, pero nunca en ausencia de expresión de IFN- γ ³¹. Los granulomas examinados en este estudio corresponden a pacientes con enfermedad tuberculosa avanzada y representan esencialmente un fracaso del sistema inmune para contener la infección. La presencia o ausencia de IL-4 no se correlaciona con un resultado de mejoría clínica o en diferencias en las etapas del granuloma o en su patología³¹.

Factor de necrosis tumoral alfa

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) se requiere para generar la respuesta granulomatosa y para una inmunidad mediada por células efectiva. Sin embargo, en grandes cantidades, puede producir fiebre, pérdida de peso, debilidad muscular y necrosis en los pulmones.

En modelos animales, la ausencia de TNF- α impide cualquier control del crecimiento de *M. tuberculosis*. La eliminación intracelular de *M. tuberculosis* está mediada por la producción de ácido nítrico inducida por el TNF- α ; sin esta inducción *M. tuberculosis* crece sin control. Sin embargo el exceso del TNF- α puede ser, como ya se dijo, en extremo dañino. Si en el modelo de experimentación el animal recibe una dosis grande de este factor, el animal muere. El análisis histopatológico muestra inflamación pulmonar tan grave que, aún cuando las micobacterias hayan sido eliminadas, el daño al huésped debido a inflamación no regulada ocasiona la muerte.

M. tuberculosis induce la secreción de TNF- α por los macrófagos, las células dendríticas y las células T. Esta citoquina se requiere para el control de la infección aguda por *M. tuberculosis*. En el ratón deficiente de TNF- α o del receptor 55-kDa del TNF, la infección por *M. tuberculosis* resulta en muerte y con cargas bacterianas muy grandes en comparación con el ratón control^{35,36}. La importancia de TNF- α en el control de la infección micobacteriana es atribuida a la activación del macrófago. El TNF- α en sinergia con el IFN- γ inducen la expresión de NOS2³⁷. La expresión de NOS2 en los granulomas de ratones TNFRp55-deficientes se retrasa en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*, aunque este mismo retraso no ha sido observado en el ratón TNF- α -deficiente.

Se ha investigado el papel de TNF- α en la formación de granulomas. En modelos murinos, en ausencia de TNF- α o del receptor TNF 55-kDa, la respuesta granulomatosa es deficiente después de la infección aguda por *M. tuberculosis*. Los granulomas que se forman están desorganizados, con pocos macrófagos epitelioides activados; dificultándose asimismo la localización de los linfocitos con los macrófagos. El TNF- α afecta la migración celular al interior de los tejidos infectados por *M. tuberculosis*. El TNF- α influye también en la expresión de las moléculas de adhesión así como en las quimioquinas y receptores de quimioquinas y esto afecta la formación de granulomas funcionales en tejidos infectados. Los múltiples mecanismos mediante los cuales el TNF- α promueve la formación efectiva del granuloma y el mantenimiento y función del mismo, deberán ser investigados en el futuro³¹.

El TNF- α ha sido también implicado en la respuesta patológica del huésped a la infección por *M. tuberculosis* y es a menudo nombrado como un factor importante en la destrucción mediada por el huésped del tejido pulmonar^{38,39}. El tratamiento con talidomida en el ratón infectado con *M. tuberculosis*, la cual disminuye la regulación de las citoquinas inflamatorias incluyendo el TNF- α y las interleuquinas IL-6 e IL-10, reduce el tamaño de los granulomas en los pulmones sin producir un cambio en el número de bacterias⁴⁰. Al alterar el balance de TNF- α en los pulmones conduce a un

aumento de la necrosis y de la patología. Experimentos recientes con BCG recombinante con expresión de TNF- α , indican que altos niveles de TNF- α causan una inflamación destructiva. Sin embargo, el TNF- α no es indispensable para la necrosis del tejido pulmonar, ya que la infección en ratones deficientes en TNF- α o en el receptor TNF resultan en necrosis asociada con altas cantidades de bacterias.

Los resultados de un estudio en un modelo murino de tuberculosis crónica persistente sugieren que el TNF- α juega un papel que limita la patología del pulmón. Los ratones con una carga bacteriana estable, seis meses después de la infección por *M. tuberculosis* fueron tratados con anticuerpos anti-TNF- α . La neutralización de TNF- α resultó en una mortalidad de 100%. La cantidad de bacterias en los pulmones del ratón tratado con anticuerpos anti-TNF aumentó, pero no a los niveles predichos como letales en el modelo, y luego se estabilizaron, sugiriendo que únicamente el número de bacterias no es responsable de la mortalidad. El examen histológico reveló que los pulmones del ratón TNF- α -neutralizado mostraban patología grave, con granulomas desorganizados, infiltración celular difusa, exudados alveolares y en algunos casos, metaplasia escamosa, la cual es una respuesta patológica a la inflamación crónica⁸. Esta inmunopatología aberrante cuando no hay TNF- α , sugiere que esta citoquina contribuye a limitar la respuesta patológica en la tuberculosis y que modula la respuesta inflamatoria en esta infección. Se ha sugerido también un papel antiinflamatorio del TNF- α durante la infección por *Corynebacterium parvum*, en la cual un ratón TNF- α -deficiente responde a la infección con inflamación severa y muerte⁴¹. Los papeles del TNF- α en la protección e inmunopatología de la infección tuberculosa son múltiples y complejos. Aunque existen datos limitados del papel de esta citoquina en la tuberculosis humana, un reporte reciente mostró que un paciente sometido a tratamiento con anticuerpos anti-TNF- α por artritis reumatoide, desarrolló diseminación fatal de la enfermedad⁴².

Interleuquina-10

En contraste con el TNF- α , la interleuquina-10 (IL-10) es generalmente considerada como primariamente antiinflamatoria. Esta citoquina, producida por macrófagos y células T durante la infección por *M. tuberculosis*, posee propiedades desactivantes de macrófagos, incluyendo la alteración de la producción de IL-12, la cual a su vez disminuye la producción de IFN- γ por las células T. Los macrófagos de pacientes tuberculosos son supresores de la proliferación de las células T *in vitro*, y la inhibición de IL-10 revierte parcialmente esta supresión⁴³. La IL-10 inhibe directamente las respuestas de los linfocitos T CD4, así como también la presentación de antígenos por las células infectadas con micobacterias (APC)⁴⁴. Estudios recientes sugieren que IL-10 puede actuar en contra de las propiedades activantes del macrófago por parte del IFN- γ , sin embargo los ratones con deficiencia de IL-10 fueron igualmente susceptibles a la infección aguda por *M. tuberculosis*, comparados con el ratón control. El papel de la IL-10 en la respuesta inmune protectora está en espera de experimentación posterior.

Interleuquina-6

La interleuquina-6 (IL-6), tiene múltiples papeles en la respuesta inmune, incluyendo *inflamación, hematopoyesis y diferenciación de las células T*. Se ha reportado un papel potencial de la IL-6 en la supresión de la respuesta de las células T⁴⁵. En este estudio, los macrófagos BCG-infectados fueron incapaces de estimular las respuestas de células T a un antígeno no relacionado y este efecto pudo ser revertido parcialmente por la neutralización de la IL-6. Después de una infección con dosis bajas de aerosol, se observó un aumento temprano en la carga pulmonar, así como la disminución de la producción de IFN- γ en los ratones IL-6-deficientes comparados con los ratones control, sugiriendo que la IL-6 es importante en la respuesta *innata inicial* al patógeno. Una vez que la inmunidad *adquirida* se desarrolló, los ratones IL-6-deficientes controlaron y sobrevivieron a la infección. La respuesta de memoria a un reto en aerosol virulento también se conservó intacta en el ratón IL-6-deficiente⁴⁰.

El ratón IL-6-deficiente sucumbe a la infección con una dosis alta de bacilos de *M. tuberculosis*. En este caso, se considera que la respuesta innata defectuosa podría haber sido rebasada por el gran número de bacterias introducidas en los pulmones⁴⁶.

Factor transformador de crecimiento TGF- β

Se ha implicado a esta citoquina *antiinflamatoria* en la supresión de las células T en pacientes con tuberculosis⁴⁷. La TGF- β está presente en las lesiones granulomatosas de estos pacientes y es producida por monocitos humanos después de la estimulación con *M. tuberculosis* o lipoarabinomannan^{48,49}. Se ha reportado que inhibe la respuesta de células T a *M. tuberculosis* y también participa en la desactivación del macrófago al inhibir la producción de NOS2 inducida por IFN- γ ^{50,51}. La regulación de esta citoquina es muy compleja y ocurre a varios niveles. No se ha probado directamente el papel de la TGF- β *in vivo* en la protección o patología en la tuberculosis.

Células T

M. tuberculosis es un ejemplo clásico de un patógeno para el cual la respuesta protectora está basada en la *inmunidad mediada por células*. Esto se debe principalmente a que el microorganismo vive dentro de las células, usualmente los macrófagos. Para controlar y eliminar la micobacteria se requiere por lo tanto de los mecanismos efectores de las células T. La investigación se ha enfocado principalmente a la respuesta de las células T CD4 a la tuberculosis, pero recientemente ha habido un interés creciente en las células T CD8. En el modelo murino, a la semana de la infección por un *M. tuberculosis* virulento, se eleva el número de células activadas T CD4⁺ y T CD8⁺ en los nódulos linfáticos que drenan a pulmón⁵². Entre dos a cuatro semanas posinfección ambos tipos de células T CD4⁺ y T CD8⁺ migran a los pulmones y muestran un fenotipo memoria/efector (CD44^{hi} y CD45^{lo} CD62L⁺); aproximadamente, 50% de estas células son CD69⁺⁵³. Esto indica que las células T activadas migran al sitio de infección y que están interactuando con las células presentadoras de antígenos (APC). El granuloma tuberculo-

so contiene ambos tipos de células T CD4 y T CD8 que probablemente tratan de contener la infección dentro del granuloma y prevenir la activación^{54,55}.

Células T CD4

M. tuberculosis reside primariamente en una vacuola dentro del macrófago. La presentación de antígenos micobacterianos de tipo antígenos de histocompatibilidad mayor (MHC) clase II a las células T CD4⁺ es un resultado de la infección⁵⁶. En modelos murinos se ha demostrado por depleción de anticuerpos de las células T CD4⁵⁷, por transferencia adoptiva⁵⁸ o por el uso de ratones con alteraciones genéticas⁵⁹, que se requiere del subgrupo de linfocitos T CD4 para controlar la infección tuberculosa. Estas células son de las más importantes en la respuesta protectora en contra de *M. tuberculosis*. Se ha demostrado, sobre todo en pacientes con infección con VIH, que la pérdida de las células T CD4⁺ aumenta importantemente la susceptibilidad a la tuberculosis aguda o de reactivación. De hecho, los sujetos VIH⁺ PPD⁺ tienen un riesgo anual de desarrollar tuberculosis activa de 8-10%, en comparación con el riesgo de por vida de 10% en pacientes PPD⁺, VIH⁻⁶⁰.

Numerosos estudios indican que las células T CD4⁺ de sujetos infectados producen IFN- γ en respuesta a una amplia variedad de antígenos micobacterianos. La función efectora principal de las células T CD4 es la producción de IFN- γ y posiblemente de otras citoquinas, suficientes para activar macrófagos, los cuales pueden controlar o eliminar a los microorganismos intracelulares. En los ratones con MHC clase II-deficientes o CD4-deficientes, los niveles de IFN- γ disminuyen severamente en etapas tempranas de la infección⁶¹. Sin embargo, tres semanas después los niveles promedio de IFN- γ en pulmones son similares a los observados en ratones control, junto con células T CD8⁺ que contribuyen sustancialmente a la producción de IFN- γ . Los ratones no pueden, sin embargo, ser rescatados por esta producción tardía de IFN- γ y sucumben a la infección. La expresión de NOS2 por los macrófagos también se retrasa en los ratones deficientes en células T CD4⁺, pero retorna a los niveles del ratón control en conjunción con la expresión del IFN- γ ⁶¹. Estos hallazgos fueron aplicados a un modelo murino de infección por *M. tuberculosis* crónica persistente⁶². Ratones infectados con una dosis baja de *M. tuberculosis* son tratados con un anticuerpo anti-CD4 iniciando seis meses posteriores a la infección. La depleción de células T CD4 resultante causa una rápida reactivación de la infección y los ratones fallecen con cargas bacterianas muy altas en los pulmones. Los niveles globales de IFN- γ son similares en los pulmones de los ratones con depleción de células T CD4⁺ y en el grupo control (tratados con IgG), debido a la producción de IFN- γ por los linfocitos CD8⁺. No hay un cambio aparente en la producción de NOS2 por el macrófago o, en su actividad en el ratón con depleción de células T CD4⁺. Esto indica que existen mecanismos IFN- γ y NOS2 independientes, pero células T CD4⁺-dependientes en el control de la tuberculosis. La mayoría de los estudios se han orientado a la producción del IFN- γ por las células T CD4⁺ en respuesta a los antígenos micobacterianos, pero otras

funciones de las células T CD4⁺ son probablemente importantes en la respuesta protectora, la cual puede ser entendida como un correlato de la inmunidad y como objetivo del diseño de vacunas.

Moléculas presentadoras de antígenos MHC clase-I, clase-II y CD1

Se ha manejado que existe un papel de las células T CD4⁺ en activar o madurar las células presentadoras de antígenos (APC) en varios sistemas. La importancia de las células T CD4⁺ sobre la acción y mantenimiento de las células T CD8 efectoras así como las funciones de memoria han sido demostradas en modelos virales y pueden ser dependientes de la interacción CD40-CD40L entre las células CD4⁺ y APC⁶³⁻⁶⁵.

Estudios recientes sugieren la importancia de las células T CD4 en la respuesta inmune a la tuberculosis. Es conocido el papel de las células T CD4⁺ en el desarrollo de una adecuada respuesta de las células B. Las células T CD4⁺ pueden producir una multitud de citoquinas además del IFN- γ , incluyendo IL-2. Es probable que la producción de citoquinas por células T CD4⁺ en un determinado momento o en estrecha proximidad al macrófago o a otras células, sea importante para controlar la infección^{66,67}. La lisis o apoptosis de células infectadas por células T CD4⁺ puede también jugar un papel en el control de la infección^{66,67}. Las células T CD4⁺ humanas pueden producir perforina y granzima, aunque estas moléculas parecen no participar en la muerte bacteriana. Los efectos de la apoptosis inducida por TNF- α sobre la viabilidad de *M. tuberculosis* en macrófagos humanos y de ratón es controvertida; algunos estudios reportan números reducidos de bacterias dentro de los macrófagos después de la apoptosis, y otros indican que este mecanismo tiene escaso efecto antimicobacteriano⁶⁸.

Los macrófagos infectados por *M. tuberculosis* parecen tener disminuida su capacidad para presentar antígenos a las células T CD4⁺, lo cual podría contribuir a la incapacidad del huésped para eliminar una infección persistente. La presentación de ovalbúmina a un hibridoma de células T se reduce después de la infección de los macrófagos por *M. tuberculosis*⁶⁹.

Un mecanismo por el cual la infección por *M. tuberculosis* podría inhibir el reconocimiento de los macrófagos por las células T CD4⁺, es rompiendo la regulación de la expresión de las moléculas MHC clase II de la superficie celular. Reiner y colaboradores usaron un *M. tuberculosis* virulento y macrófagos humanos para demostrar claramente que la reducción más grande en la expresión de MHC clase II ocurre cuando las células también se exponen a IFN- γ ⁷⁰. El efecto es dependiente de la multiplicidad de infección (MOI) y el bacilo muerto es mucho menos efectivo que los bacilos vivos para reducir la presentación de antígeno. Otro APC, la célula dendrítica, tiene constitutivamente altos niveles de MHC clase II. La infección de estas células con *M. tuberculosis* no resulta en una expresión reducida de MHC clase-II de la superficie celular^{29,71}. Es por lo tanto, menos probable que la infección con *M. tuberculosis* afecte la activación de las células T CD4⁺, que es una función

primaria de las células dendríticas *in vivo*. Esto se apoya en el hecho de una fuerte respuesta de células T CD4⁺ a la infección por *M. tuberculosis*. Otro mecanismo mediante el cual la APC contribuye a la estimulación defectuosa de células T puede ser la producción de citoquinas, incluyendo TGF- β ⁴⁷⁻⁴⁹, IL-6^{45,46} o IL-10⁵⁰. La producción de estas citoquinas por macrófagos infectados puede afectar directa o indirectamente la proliferación y función de células T. Se observa claramente una respuesta sustancial de células T CD4⁺ en pacientes infectados con *M. tuberculosis*. En resumen, lo inadecuado de esta respuesta para la eliminación de las bacterias puede ser parcialmente a nivel del reconocimiento y activación de los macrófagos infectados. *M. tuberculosis* interfiere en la modulación de presentación de antígenos para evitar la eliminación por las células T.

Células T CD8⁺

Aunque los bacilos de *M. tuberculosis* han sido observados en el citoplasma⁷², la mayoría de los investigadores consideran que estos microorganismos usualmente residen dentro de una vacuola. Ya que la presentación MHC clase-I es más eficiente con los antígenos citoplásmicos, el posible papel de las células T CD8⁺ en la respuesta inmune a *M. tuberculosis* recibió poca atención durante muchos años.

Un obstáculo en el estudio de células T CD8⁺ ha sido el aislar células T CD8 citolíticas (CTL) específicas de humanos infectados por *M. tuberculosis*. En años recientes se aislaron células T CD8⁺ específicas para antígenos micobacterianos de huéspedes infectados o generados por inmunización^{73,74}. Aunque se ha demostrado la presencia de estas células, el reconocimiento de células infectadas con *M. tuberculosis* por células T CD8⁺, el objetivo relevante *in vivo*, no ha sido reportado. Ya que la activación de respuestas CTL puede ocurrir en células infectadas o en células dendríticas que captan fragmentos apoptóticos de macrófagos infectados⁷⁵, la mera presencia de células T CD8⁺ específicas para un antígeno micobacteriano en un huésped infectado no demuestra que estas células puedan reconocer células infectadas *in vivo*. Para ser efectivas las células T CD8⁺ necesitan responder a macrófagos infectados o con secreción de IFN- γ , o con respuestas citotóxicas; por lo tanto, es necesario demostrar este reconocimiento por las células T CD8⁺ específicas para un antígeno micobacteriano definido. Estudios recientes en ratones han demostrado que las células T CD8⁺ migran a los pulmones con una cinética similar a la de las células T CD4⁺ después de la infección tuberculosa⁷⁶. Estas células son capaces de producir IFN- γ , y lisar macrófagos infectados. Las células T CD8⁺ en infecciones micobacterianas están clásica o no clásicamente restringidas.

Células T CD8⁺ MHC clase I-restringidas

Las células T CD8⁺ MHC clase-I de ratón y células humanas infectadas con *M. tuberculosis* o inmunizadas con BCG reconocen varios antígenos incluyendo 38-kDa⁷⁷, 65-kDa (que se produce en gran cantidad en condiciones negativas de cultivo, tales como la elevada temperatura)⁷⁸ y 19kDa⁷⁹. Recientemente en humanos y, en líneas específicas de

células T CD8⁺ MHC clase-I-restringidas para tres antígenos diferentes, se demostró que estas células reconocen macrófagos infectados y en respuesta producen IFN- γ y lisan las células. Aunque uno de los antígenos identificados fue el Ag85, una proteína *secretada*, las otras líneas celulares de células T CD8⁺ reconocieron antígenos *citoplásmicos*. Los estudios que incluyen antígenos reconocidos por células T CD8⁺ de huéspedes infectados sin tuberculosis activa, ofrecen candidatos atractivos para generación de vacunas y apoyan la noción de que las respuestas de células T CD8⁺ así como de células T CD4⁺, deben ser estimuladas para obtener una inmunidad protectora.

Se desconocen los mecanismos mediante los cuales las proteínas micobacterianas ganan acceso a las moléculas MHC clase-I. En general, es necesario el acceso del antígeno al citoplasma celular para su procesamiento y transporte a la luz del retículo endoplásmico para la presentación por las moléculas MHC clase-I. Los bacilos en los macrófagos se han encontrado fuera del fagosoma 4-5 días después de la infección, pero la presentación de antígenos micobacterianos por los macrófagos infectados a las células T CD8 pueden ocurrir tan temprano como 12 horas después de la infección, aunque el reconocimiento del blanco-objetivo mejora con el tiempo⁸⁰. Dos reportes ofrecen evidencia de un poro o fractura inducido por las micobacterias en la membrana vesicular que rodea al bacilo y que pudiera permitir al antígeno micobacteriano entrar al citoplasma de la célula infectada. La infección por *M. tuberculosis* de los macrófagos facilita la presentación de MHC clase-I de ovalbúmina soluble, indicando que este antígeno penetra en los fagosomas a través del acceso al citoplasma inducido por *M. tuberculosis*⁸¹. Este efecto fue dependiente del MOI así como de la virulencia relativa del microorganismo usado. El *M. tuberculosis* inactivado por calor o fijado no facilita la presentación de ovalbúmina, sugiriendo que *M. tuberculosis* genera activamente el poro en el fagosoma. En un modelo que utilizó células vivas, la infección por BCG de macrófagos facilitó el transporte de moléculas por encima de 70-kDa del citoplasma al interior de los fagosomas contenido bactérias. Esto apoya la existencia de un poro presumiblemente bidireccional inducido por una infección micobacteriana. La bacteria puede usar este poro para obtener nutrientes o para introducir moléculas tóxicas dentro del citoplasma. Una consecuencia puede ser la introducción de una amplia variedad de antígenos micobacterianos dentro del citoplasma por procesamiento y presentación por las moléculas MHC clase-I.

Células T CD8+ no-clásicamente restringidas

Las moléculas CD1 son moléculas presentadoras de antígenos no polimórficas; el Grupo-I de moléculas CD1 incluyen CD1a, b y c, mientras el Grupo II incluye CD1d. Las moléculas CD1 tienen similitud estructural con las moléculas MHC clase-I, con un puente no covalente de β 2-microglobulina en ambas moléculas. Sin embargo, el puente de CD1 es mucho más profundo y mucho más hidrofóbico que las moléculas MHC clases-I y II. Los CD1 presentan lípidos y glicolípidos a las células T. Las células T CD1-

restringidas son a menudo CD4- o CD8⁺, pero un estudio reciente indicó que CD1 podría también presentar antígeno a las células T CD4⁺. Actualmente, hay evidencia de que un amplio repertorio de antígenos puede ser reconocido por las células T.

El grupo 1 de moléculas CD1 parecen mostrar diferentes compartimentos de la célula para la presentación de antígenos. CD1a no tiene una señal de localización endosomal en su cola citoplásmica, mientras que CD1b y CD1c sí. CD1a ha sido localizado primariamente en la membrana plasmática y en los endosomas tempranos⁸². CD1b fue encontrada principalmente en el endosoma tardío, en los fagolisosomas y en los compartimentos MHC clase II⁸³. En contraste, aunque CD1c fue observado en los compartimentos endosomales, éste fue mucho más fuertemente expresado sobre la superficie celular^{84,85}. Datos recientes indican que los lípidos de la micobacteria dentro de los fagosomas pueden ser transportados y exportados de la célula en una vesícula endocítica y que ésta a su vez puede ser tomada por las células para la presentación a los linfocitos T⁸⁴. Las diferencias, en la localización de CD1 pueden ser importantes en determinar cuáles antígenos lípidos son presentados por cada molécula, y así, junto con la presentación de las moléculas MHC clase-I y II, permitir una presentación completa de los antígenos micobacterianos por las células T. Se necesita aclarar cuál es el papel de las células CD1-restringidas en la respuesta inmune innata y adaptativa. En estudios tempranos, las respuestas CD1-restrictivas a lípidos micobacterianos fueron generadas *in vitro* de los PBMC de sujetos PPD⁺ y PPD^{85,86}. Un estudio reciente ofreció la primera evidencia de una respuesta de memoria de las células T a un antígeno CD1-restringido en sujetos PPD⁺ expuestos a *M. tuberculosis*. Los PBMC de estos sujetos proliferaron a un glicolípido isoprenoide, en contraste a los PBMC de sujetos PPD⁻ y esta proliferación fue inhibida por anticuerpos anti-CD1c⁸⁷. Las funciones efectoras de células CD8⁺ CD1-restringidas incluyeron la producción de IFN- γ y actividad citotóxica, pero el objetivo de estas células *in vivo* pudiera no ser los macrófagos. Las moléculas CD1 se encuentran habitualmente en las células dendríticas *in vivo*⁸⁸ aunque un bajo nivel de expresión sobre los macrófagos puede ser suficiente para permitir el reconocimiento de las células T CD1-restringidas *in vivo*. Las células dendríticas presentes en los pulmones pueden ser estimuladas por células CD1-restringidas en el granuloma que pudieran tener un efecto sobre los macrófagos infectados. Los datos *in vitro* indican que las células dendríticas pueden ser infectadas con *M. tuberculosis*⁸⁴ y quizás las células CD1-restringidas sirvan para monitorear este reservorio de infección.

Los datos sugieren que se requiere posterior investigación sobre el procesamiento y presentación de antígenos micobacterianos a las células CD8 para entender cuál es la contribución potencial de este subgrupo a la protección.

Funciones efectoras de células T CD8⁺

Existen al parecer dos funciones efectoras primarias de las células T CD8 en la tuberculosis, la lisis de células infectadas y la producción de citoquinas, principalmente de IFN- γ . Las

contribuciones relativas de estas funciones en la infección son desconocidas. El papel de este subgrupo celular en controlar o, eliminar la infección es una pregunta importante con respecto al diseño de una vacunación efectiva o de estrategias inmunoterapéuticas.

Se ha reportado que las células T CD8⁺ específicas para antígenos antimicobacterianos de ratones y de humanos producen IFN- γ . El papel de IFN- γ en las infecciones micobacterianas es la activación macrofágica y resulta probable que las células T CD8⁺ puedan participar en esta función. Las células T CD8⁺ de los pulmones de ratones infectados son activadas para producir IFN- γ y secretan esta citoquina como ligando de la molécula del receptor de la célula (TCR) o por interacción con las células dendríticas infectadas con *M. tuberculosis*^{89,90}. Sin embargo, a diferencia de las células T CD4⁺, la producción espontánea de IFN- γ por las células T CD8⁺ es muy baja, sugiriendo que la producción de esta citoquina por las CD8 en los pulmones es limitada⁹¹. Esto podría ser debido a señales ineficaces para la producción de IFN- γ por APC infectados en los pulmones. Un estudio indicó una modesta protección transferida mediante células T CD8⁺ que fue parcialmente dependiente de la producción de IFN- γ . Aunque la importancia de la producción de IFN- γ por células T CD8⁺ en un ratón inmunocompetente no ha sido probada.

La lisis de células blanco por las células CD8 puede ocurrir vía perforina y granzima o vía Fas/FasL. La lisis mediada por perforina es considerada un componente importante de la respuesta celular de CD8 en las infecciones virales. No obstante, la presencia de células lisadas conteniendo bacterias vivas capaces de sobrevivir *extracelularmente* parece ser una contra-respuesta protectora. Una hipótesis sugiere que los macrófagos infectados por *M. tuberculosis* que son incapaces de eliminar los organismos intracelulares debido ya sea a su activación defectuosa o a una infección masiva, podrían beneficiarse al ser lisados y permitir así la liberación de las bacterias⁹². Las bacterias liberadas podrían entonces ser captadas por macrófagos activados dentro del granuloma y presumiblemente destruidos.

Hay evidencia de un papel más directo de la CTL CD8⁺ en el control de la infección por *M. tuberculosis*. La lisis de células dendríticas infectadas humanas y macrófagos por células específicas CD8⁺ CD1 y MHC clase-I restringidas para antígenos de *M. tuberculosis* redujo el número de bacterias intracelulares⁹³. La muerte de bacterias intracelulares fue dependiente de perforina. La perforina se requirió para formar un poro, pero la molécula responsable de la muerte de organismos intracelulares fue la granulisina, otra proteína citotóxica⁹⁴. La incubación de *M. tuberculosis* con granulisina sola fue suficiente para matar a los microorganismos. Un trabajo reciente indica que un subgrupo de clones murinos CD8⁺ específicos que puede transferir un grado de protección *in vivo* pueden lisiar macrófagos infectados vía un mecanismo mediado por perforina. A una razón elevada efecto-blanco (50:1), la lisis redujo el número de bacterias. La muerte micobacteriana fue dependiente de perforina y en una menor extensión de la producción de IFN- γ .

Las dudas acerca de la importancia relativa de la función CTL de CD8⁺, en el control de la infección micobacteriana surge de experimentos que indican que el ratón deficiente en perforina, fue capaz de controlar la infección aguda por *M. tuberculosis*. Sin embargo, datos recientes indican que las células CD8⁺-perforina-deficientes están hiperactivadas sugiriendo un papel regulatorio de la perforina en el sistema inmune. Además, en el ratón deficiente en perforina e infectado por *M. tuberculosis*, se encontró un gran número de células T CD8 en los pulmones rápidamente después de la infección y se expresaron altos niveles de CD69 y CD25, comparados con el ratón salvaje⁶⁴. Más sorprendentemente, se aumentó cuatro veces más la producción de IFN- γ en los pulmones por el subgrupo de células T CD8⁺ que en el ratón perforina-deficiente, sugiriendo que un efecto compensatorio protege al ratón perforina-deficiente de la infección aguda. En un estudio reciente el ratón perforina-deficiente sucumbió a la infección, pero tardíamente.

Migración celular y formación de granuloma

Una respuesta inflamatoria exitosa del huésped en contra de microbios invasivos, requiere de una coordinación precisa y muchos elementos inmunológicos. Un primer paso, es el reclutamiento de las células intravasculares inmunes a la proximidad del foco infeccioso y preparar la extravasación. Ésta es controlada por moléculas de adhesión y las citoquinas. Los ratones que tienen truncada la molécula 1 de adhesión intracelular (ICAM-1), se muestran deficientes en la formación de granuloma, aunque no se impide el control de la infección⁹⁵. Las quimioquinas contribuyen a la migración celular y localización, así como al efecto de maduración y diferenciación de las respuestas de células T^{96,97}. Algunas de las dificultades en estudiar las respuestas de quimioquinas a agentes infecciosos han sido debido a la carencia de modelos, particularmente en el sistema murino.

La función de las quimioquinas en la infección por *M. tuberculosis* se han investigado de manera limitada. En modelos murinos *in vivo* y *in vitro*, *M. tuberculosis* induce la producción de una variedad de quimioquinas^{98,99}. La infección *in vitro* de los macrófagos alveolares humanos induce producción de quimioquinas; los monocitos, células de nódulos linfáticos y de líquido de lavado broncoalveolar de pacientes con tuberculosis pulmonar muestran niveles elevados de un subgrupo de estas citoquinas en comparación con controles sanos. En las Tablas I, II y III, se resumen los resultados de los estudios presentados.

CORRELATOS DE RESPUESTA INMUNE PROTECTORA A *M. TUBERCULOSIS*

Descripción de estudios epidemiológicos realizados en contactos de pacientes con tuberculosis pulmonar

La respuesta TH1 que constituye la respuesta inmune protectora a *M. tuberculosis*, se encuentra controlada por interleuquina-1 e interleuquina-12, mediada por células T CD4 secretando interleuquina-2 e interferón γ , probablemente, algunas células T CD4 se diferencien y conviertan en células T de memoria de larga vida, expresando un *fenotipo de memoria*. Las células T CD8 prolongan la sobrevida del

ratón infectado y secretan interferón. De ahí que los estudios que han intentado establecer correlatos de respuesta protectora hayan utilizado la inducción de la producción de gamma interferón (QuantiFERON) e interleuquinas mediante antígenos micobacterianos (Tabla IV).

Se han utilizado distintos antígenos de *M. tuberculosis* para inducir respuesta en sangre total. Se han empleado filtrados de cultivo, fracciones de masa molecular baja, fitohemaglutinina y principal y recientemente el antígeno ESAT-6 y CFP-10. Asimismo, se han utilizado antígenos de *M. avium*, *M. bovis*, PPD *avium* o *bovis* (Tabla IV). Aunque, los datos de modelos experimentales y de estudios en pacientes con tuberculosis pulmonar y sus contactos domiciliarios indican que la producción de gamma-interferón en sangre total estimulada por *M. tuberculosis* es, aunque imperfecto, el mejor correlato de inmunidad disponible¹⁰⁰.

El estudio de Streeton, realizado en 952 muestras de sangre de donadores voluntarios tuvo como objetivo determinar la sensibilidad y especificidad de una prueba sanguínea de gamma-interferón en el diagnóstico de la infección tuberculosa. La prueba tuvo una especificidad de 98% (individuos con exposición no conocida a la tuberculosis fueron negativos) y una sensibilidad del 90% (individuos PPD positivos sin tratamiento, fueron positivos). La prueba detectó respuestas positivas en 83% de los individuos con enfermedad activa probada, 59% de aquellos previamente tratados, 80% de aquellos con enfermedad

inactiva no tratada y 43% expuestos, pero PPD negativos. Los autores señalan que esta prueba, la medición del gamma interferón por los linfocitos sanguíneos estimulados con PPD es un método rápido, específico y sensible para detectar la infección por *M. tuberculosis*¹⁰¹.

Demissie y colaboradores, analizaron 65 pacientes VIH negativos con tuberculosis. Encontraron que en comparación con estos casos, sus contactos tuvieron una mayor respuesta proliferativa de los leucocitos a antígenos micobacterianos. Sugieren que esta respuesta mayor indica una infección reciente en los contactos y de su resultado dependerá que exista o no enfermedad¹⁰².

Schwander y Sada, en México, midieron células productoras de IFN- γ , IFN- γ y síntesis de DNA en células broncoalveolares y PBMC. Encontraron una respuesta inmune aumentada al antígeno 85, la cual interpretan como posiblemente protectora. Proponen buscar correlatos inmunológicos para prueba de vacunas¹⁰³.

En un trabajo reciente de Lalvani, realizado en el Reino Unido en pacientes con tuberculosis pulmonar, la producción de IFN- γ al antígeno ESAT-6 tuvo una sensibilidad para el diagnóstico de 96% (IC95% 92-100%). En contactos PPD positivos, la positividad a la prueba fue de 86% comparado con cero porciento en los contactos PPD negativos, BCG positivos¹. Un estudio de los mismos autores realizado en 50 contactos sanos encontró resultados similares, con un riesgo de 12 veces más de tener la prueba

Tabla I. Respuesta inmune a *M. tuberculosis*. Mecanismos antimicobacterianos.

Células	Mecanismo	Mecanismos	Resultado
Macrófago	Fusión fagolisosomal Mecanismos basados en radicales libres Receptores TLR2 y TLR4	Lisosoma degradada y procesa macromoléculas Intermediarios de oxígeno (oxígeno tóxico) Óxido nítrico (NO) Efecto antimicrobiano Activación de células inmunes por el patógeno	Acción antimicrobiana Acción bactericida Hallado en pacientes con TB Inducción de IL-12 Inducción de sintetasa de óxido nítrico (NOS2)
Citoquinas macrófagos y células T	Interleuquina-12	Induce respuesta TH1 (con producción de interferón- γ)	Disminuye número de bacterias y aumenta sobrevida
Macrófagos alveolares y células T	Interferón- γ Interleuquina-4 Factor de necrosis tumoral- α	Respuesta protectora a MTB Induce respuesta TH2 Control de la infección aguda por MTB Participa en formación de granulomas Interviene en respuesta patológica Mediador de la activación de macrófagos	Control de la infección No ha sido asociada a tuberculosis Permite sobrevida y disminuye cargas bacterianas Múltiples mecanismos de acción Principal factor de necrosis de tejido pulmonar, limita respuesta patológica
	Interleuquina-10	Primariamente antiinflamatoria	Desactiva macrófagos Disminuye IL-12 Disminuye interferón- γ
	Interleuquina-6	Inflamación Hematopoyesis Diferenciación de células T	Probablemente participe en la respuesta innata a MTB

Tabla II. Respuesta inmune a *M. tuberculosis*. Células que participan en la respuesta inmune.

Células	Mecanismo	Mecanismos	Resultado
Células T CD4	Respuesta inmune protectora a MTB	Producción de interferón- γ Expresión de NOS2 Células T actúan sobre macrófagos Actúan sobre células T CD8 Células T actúan sobre células B Producen citoquinas Células T CD4 Mantienen infección crónica persistente	Activación macrófagos Control de la infección Eliminación de bacilos intracelulares Maduran CPA en distintos sistemas* Activan y mantienen funciones efectoras de las células T CD8 Se desconocen funciones IL-2 e interferón- γ Apoptosis Granuloma tuberculoso
Células T CD8	Células infectadas migran a pulmón Acceden a moléculas MHC-clase I Lisis celular	Inducen producción limitada de interferón- γ Lisan macrófagos infectados Mediada por perforina y granulosina	Activación de macrófagos Reducción de número de bacterias intracelular La perforina se requiere para formar un poro La granulosina (proteína granular citotóxica) es la responsable de la muerte bacteriana Granuloma tuberculoso

*Células presentadoras de antígenos

Tabla III. Mecanismos patogénicos de *M. tuberculosis*.

	Mecanismo	Mecanismos	Resultados
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Evita la unión fagolisosomal	Impide degradación y procesamiento de antígenos Ureasa micobacteriana Alcalinización del fagolisosoma Producción micobacteriana de amonio Glutamino-sintetasa	Acción antimicrobiana
	Evita acción de los intermediarios de oxígeno (oxígeno tóxico) Limita activación de macrófagos por interferón- γ	Lipoarabinomanan (LAM) y Fenolicoglicolípido-1 Previene a los macrófagos para responder al interferón- γ	Síntesis de amonio Evita el ambiente tóxico dentro de la vacuola lisosomal inhibiendo potencia de enzimas vía alcalinización. Destructores de radicales de oxígeno
Macrófagos infectados por <i>M. tuberculosis</i>	Macrófagos infectados por MTB	Producción de citoquinas disminuida Alteran expresión de moléculas MCH-II Reducen reconocimiento y activación de macrófagos infectados	Respuesta inadecuada para eliminación de bacterias No presentan antígenos a células T CD4 Impiden la modulación de la presentación de antígenos
Macrófagos infectados con <i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i> , activamente genera un poro o fractura en la membrana vesicular que rodea al bacilo en el fagosoma	Facilita el transporte de moléculas desde el citoplasma al interior de los fagosomes que contienen micobacterias Penetra el antígeno micobacteriano a la célula infectada. Poro bidireccional <i>M. tuberculosis</i> , podría utilizar este poro para obtener nutrientes o introducir moléculas tóxicas dentro del citoplasma	Al introducir moléculas en el citoplasma de la célula, facilita procesamiento y presentación de antígenos

Tabla IV. Estudios inmunológicos en poblaciones humanas para evaluar respuesta inmune protectora a *M. Tuberculosis*.

Autor	Año/lugar	Población	Número	Prueba	Resultado
Streeton ¹⁰¹	1998/Australia	Muestras de sangre heparinizadas	952	Q-IFN Antígenos PPD <i>avium</i> o bovino fitohemaglutinina Especificidad 90%	Sensibilidad 98%
Demissie ¹⁰²	1999/Etiopía	VIH-TB	65	Filtrado de cultivo 10 fracciones Respuestas proliferativas de los leucocitos a los antígenos	Contactos, mayor respuesta Infección temprana
Schwander ¹⁰³	2000/Méjico	Contactos VIH- Controles	10 15	Células productoras de IFN- γ , IFN- γ , Síntesis DNA en células broncoalveolares y PBMC	Respuesta inmune aumentada a Ag 85 puede ser protectora
Lalvani ¹	2001/Reino Unido	Pacientes TB	47	IFN- γ a ESAT-6 (IC95% 92-100%)	Sensibilidad 96%
		Controles No TB	47	IFN- γ a ESAT-6	85%
		Contactos PPD+		IFN- γ a ESAT-6	0%
		Contactos PPD-BCG+			
Lalvani ⁷³	2001/Reino Unido	Contactos sanos	50	IFN- γ a ESAT-6 <i>versus</i> grados de exposición Antígeno PPD	RM=9.0 (2.6-31.6) P=0.001 Unidad de aumento por nivel de exposición RM=1.9 (1.0-3.5) P=0.05
		BCG+		ESAT-6	0.07
		PPD+ BCG+		ESAT-6	RM=12.1 (1.3-115.7)
		Contactos domiciliarios		ESAT-6	>30% producen IFN- γ
Fjallbrant ¹⁰⁵	2001/Suecia	Trabajadores de la salud	381	IFN- γ Respuesta de transformación de linfocitos	Significativamente más altos en PPD+
		PPD+	11		Respuesta inmune protectora más fuerte en PPD+ que en BCG+PPD+ PPD+ prueba de protección
		PPD-	11		
Katial ¹⁰⁶	2001/ Estados Unidos	Trabajadores de la salud	40	Q-IFN y PPD	Kappa de Cohen 0.73
		PPD+ PPD-	20		
			20		

positiva en los sujetos PPD positivos, BCG positivos⁷⁵. Este resultado es similar al encontrado por Demissie en 1999¹⁰⁴.

Los resultados de estos autores se vieron confirmados por el estudio de Vakemans y colaboradores, en Gambia quienes compararon contactos sanos *versus* controles comunitarios con exposición no conocida a *M. tuberculosis*. En este estudio los contactos PPD positivos tuvieron una respuesta de IFN- γ significativamente mayor a la observada en controve-

les no expuestos. Se documentó que de los sujetos controles no expuestos el 30% produce IFN- γ , en comparación con los contactos domiciliarios en los que más del 30% produce IFN- γ ¹⁰⁴. En un estudio realizado en Suecia en trabajadores de la salud PPD positivos y PPD negativos, la respuesta de transformación de linfocitos fue dos a tres veces mayor y la de IFN- γ 7 a 10 veces más grande en los PPD positivos que en los BCG positivos PPD negativos, por lo que estos últimos

autores confirman el carácter de respuesta protectora que tiene la reactividad a PPD¹⁰⁵.

También en un trabajo realizado en trabajadores de la salud en los Estados Unidos, encontraron un valor de Kappa de Cohen de 0.73 entre la producción de IFN- γ y el PPD¹⁰⁶. Esto habla del aumento de especificidad en el diagnóstico de infección natural por *M. tuberculosis* que se logra con el antígeno ESAT-6 u otros antígenos altamente específicos.

La inducción de producción de IFN- γ mediante retos con antígenos específicos se está estudiando intensamente. En un estudio reciente se utilizó una prueba diagnóstica simple en sangre total (producción IFN- γ) en un intento de superar las desventajas de la prueba cutánea de PPD (aplicación, lectura, interpretación, etcétera) para el diagnóstico de infección tuberculosa¹⁰⁷. Los autores utilizaron la prueba de QuantiFERON-TB para medir la producción de gamma interferón (IFN- γ) después de la estimulación *in vitro* de la sangre total con PPD de *M. tuberculosis* y *M. avium* para la detección de infección. En humanos, la prueba de QuantiFERON-TB resultó tener mayor sensibilidad en un grupo de usuarios de drogas intravenosas¹⁰⁸, en tanto la especificidad de la prueba se redujo en sujetos que habían sido vacunados con BCG seis meses antes. En el referido estudio se demostró que un elevado grupo de donadores sanos vacunados con BCG respondió a la prueba de QuantiFERON-TB basada en PPD comparado a ESAT-6 o CFP-10, sugiriendo que estos últimos antígenos pueden ser una alternativa poderosa para aumentar la sensibilidad de la prueba diagnóstica.

En países en donde la vacunación con BCG es rutinaria, es evidente la importancia de contar con una prueba más sensible y específica para el diagnóstico de infección por *M. tuberculosis*.

De la revisión de estos estudios inmunológicos en contactos de pacientes con tuberculosis activa se puede sugerir que:

1. La producción de IFN- γ , en respuesta a antígenos micobacterianos es significativamente mayor en los contactos de pacientes con tuberculosis activa, en comparación con las cantidades encontradas en controles comunitarios o sujetos con exposición no conocida a *M. tuberculosis*.
2. La respuesta inmune en los contactos PPD positivos es una respuesta protectora dada por la exposición reciente a *M. tuberculosis*.
3. La respuesta inmune elevada con producción de IFN- γ que se observa en los contactos de casos de TBA, es independiente de la condición de BCG del sujeto. Es más, cuando se compara la respuesta entre contactos expuestos y controles no expuestos BCG positivos, la respuesta de éstos últimos es significativamente menor.
4. Surge la pregunta si esta producción de IFN- γ es siempre protectora.

Además de las conclusiones señaladas en cada apartado, es evidente que la investigación de la respuesta inmune a la infección con *Mycobacterium tuberculosis* y de los correlatos

de inmunidad protectora a la micobacteria en humanos, significan la probabilidad futura de poder probar vacunas.

REFERENCIAS

1. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, et al. *Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells*. Am J Respir Crit Care Med 2001;163:807-808.
2. Milburn HJ. *Primary tuberculosis*. Curr Opin Pulm Med 2001;7:133-141.
3. Riley LW. *Determinants of cell entry and intracellular survival of Mycobacterium tuberculosis*. Trends Microbiol 1995;3: 27-31.
4. Daniel TM, Ellner JJ. *Immunology of tuberculosis*. In: Lee BR, Earl SH, editors. *Tuberculosis. A comprehensive international approach. Lung biology in health and disease*. New York: Marcel Dekker; 1993.
5. Munk ME, Kaufmann SH. *The immune response to Mycobacterium tuberculosis*. Behring Inst Mitt 1991;88:27-35.
6. Yoshida N. *Role of gamma/delta T-cells in the peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis*. Kurume Med J 2001;48:175-181.
7. Cooper AM, D'Souza C, Frank AA, Orme IM. *The course of Mycobacterium tuberculosis infection in the lungs of mice lacking expression of either perforin -or granzyme-mediated cytolytic mechanisms*. Infect Immun 1997;65:1317-1320.
8. Flynn JL, Chan J. *Immunology of tuberculosis*. Annu Rev Immunol 2001;19:93-129.
9. Mellman I, Fuchs R, Helenius A. *Acidification of the endocytic and exocytic pathways*. Annu Rev Biochem 1986;55:663-700.
10. Ohkuma S, Poole B. *Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents*. Proc Natl Acad Sci USA 1978;75: 3327-3331.
11. Harth G, Clemens DL, Horwitz MA. *Glutamine synthetase of Mycobacterium tuberculosis: extracellular release and characterization of its enzymatic activity*. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:9342-9346.
12. Harth G, Horwitz MA. *An inhibitor of exported Mycobacterium tuberculosis glutamine synthetase selectively blocks the growth of pathogenic mycobacteria in axenic culture and in human monocytes: extracellular proteins as potential novel drug targets*. J Exp Med 1999;189:1425-1435.
13. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. *Nitric oxide and macrophage function*. Annu Rev Immunol 1997;5:323-350.
14. Chan J, Flynn JL. *Nitric oxide in Mycobacterium tuberculosis infection*. In: *Nitric oxide and infection*. New York: Plenum, 1999:281-310.
15. Nicholson S, Bonecini-Almeida M, Lapa e Silva JR, Nathan C, Xie QW, Mumford R, et al. *Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis*. J Exp Med 1996;183:2293-2302.
16. Wang CH, Liu CY, Lin HC, Yu CT, Chung KF, Kuo HP. *Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages*. Eur Respir J 1998;11:809-815.
17. Walker L, Lowrie DB. *Killing of Mycobacterium microti by immunologically activated macrophages*. Nature 1981; 293: 69-70.
18. Flesch I, Kaufmann S. *Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma activated bone marrow macrophages and*

differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1987;138:4408-4413.

19. Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* 1992;175:1111-1122.
20. Chan J, Fujiwara T, Brennan P, McNeil M, Turco SJ, Sibley JC, et al. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2453-2457.
21. Brightbill HD, Libratty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999;285:732-736.
22. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptors-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14459-14463.
23. Ladel CH, Szalay G, Reidel D, Kaufmann SHE. Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. *Infect Immun* 1997;65:1936-1938.
24. Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1997;159:635-643.
25. Cooper AM, Roberts AD, Roades ER, Callahan JE, Getzy DM, Orme IM. The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* 1995; 84:423-432.
26. Ottenhoff TH, Kumararatne D, Casanova JL. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-1-cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today* 1998;19:491-494.
27. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VLD, Lima VMF, Faccioli LH, Stavropoulos E, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 1999;400:269-271.
28. Lyadova I, Yeremeev V, Majorov K, Nikonenko B, Khaidukov S, Kondratieva T, et al. An ex vivo study of T lymphocytes recovered from the lungs of I/St mice infected with and susceptible to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1998;66:4981-4988.
29. Lalvani A, Brookes R, Wilkinson R, Malin A, Pathan A, Andersen P, et al. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:270-275.
30. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffen JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon-gamma gene disrupted mice. *J Exp Med* 1993; 178: 2243-2248.
31. Fenhalls G, Wong A, Bezuidenhout J, van Helden P, Bardin P, Lukey PT. In situ production of gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor alpha mRNA in human lung tuberculous granuloma. *Infect Immun* 2000; 68: 2827-2836.
32. Lin Y, Zhang M, Hofman FM, Gong J, Barnes PF. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect Immun* 1996;64:1351-1356.
33. Zhang M, Lin Y, Iyer DV, Gong J, Abrams JS, Barnes PF. T cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995;63:3231-3234.
34. Hernandez PR, Pavon L, Arriaga K, Orozco H, Madrid MV, Rook G. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect Immun* 1997;65:3317-3327.
35. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *M. tuberculosis* in mice. *Immunity* 1995;2:561-572.
36. Bean AG, Roach DR, Briscoe H, France MP, Korner H, Sedgwick JD, et al. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol* 1999;162:3504-3511.
37. Liew FY, Li Y, Millott S. Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol* 1990;145:4306-4310.
38. Rook GAW, Taverne J, Leveton C, Steele J. The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumour necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology* 1987;62:229-234.
39. Rook GAW. *Mycobacteria, cytokines and antibiotics*. *Pathol Biol (Paris)* 1990; 38: 276-280.
40. Moreira AL, Tsanova-Berkova L, Wang J, Laochumroonvorapong P, Freeman S, Freedman GK. Effect of cytokine modulation by thalidomide on the granulomatous response in murine tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 1997;78:47-55.
41. Hodge-Dufour J, Marino MW, Horton MR, Jungbluth A, Burdick MD, Strieter RM, et al. Inhibition of interferon gamma induced interleukin 12 production: a potential mechanism for the anti-inflammatory activities of tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13806-13811.
42. Maini R, St Clair EW, Breedveld F, Furst D, Kalden J, Weisman M, et al. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. *ATTRACT Study Group*. *Lancet* 1999;354:1932-1939.
43. Gong J-H, Zhang M, Modlin RL, Linsley PS, Iyer D, Ling Y, et al. Interleukin-10 downregulates *Mycobacterium tuberculosis*-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. *Infect Immun* 1996;64:913-918.
44. Rojas M, Olivier M, Gros P, Barrera LF, Garcia LF. TNF- α and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *J Immunol* 1999;162:6122-6131.
45. VanHeyningen TK, Collins HL, Russell DG. IL-6 produced by macrophages infected with *Mycobacterium* species suppresses T cell responses. *J Immunol* 1997;158:330-337.
46. Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reinfenberg K, Kopf M, Kaufmann SHE. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. *Infect Immun* 1997;65:4843-4849.
47. Hirsch CS, Ellner JJ, Blinkhorn R, Toossi Z. In vitro restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against *Mycobacterium tuberculosis* by natural inhibitors of transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3926-3931.
48. Toossi Z, Gogate P, Shiratsuchi H, Young T, Ellner JJ. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculosis granulomatous lung lesions. *J Immunol* 1995;154:465-473.
49. Dahl KE, Shiratsuchi H, Hamilton BD, Ellner JJ, Toossi Z. Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1996;64:399-405.
50. Rojas RE, Balaji KN, Subramanian A, Boom WH. Regulation of human CD+ alphabeta T-cell-receptor-positive TCR(+) T cells by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. *J Immunol* 1997;159:399-405.

and gammadelta TCR(+) T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* by interleukin-10 and transforming growth factor beta. *Infect Immun* 1999;67:6461-6472.

51. Ding A, Nathan CF, Graycar J, Derynck R, Stuehr DJ, Srimal S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors beta 1-beta2 and beta3 factor inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. *J Immunol* 1990;145:940-944.
52. Serbina NV, Liu CC, Scanga CA, Flynn JL. CD8+ cytotoxic T lymphocytes from lungs of *M. tuberculosis* infected mice express perforin in vivo and lyse infected macrophages. *J Immunol* 2000;165:353-363.
53. Feng CG, Bean AG, Hooi H, Briscoe H, Britton WJ. Increase in gamma interferon-secreting CD8(+), as well as CD4 T(+) cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1999;67:3242-3247.
54. Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Koller B, Bloom BR. Major histocompatibility complex class-I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:12013-12017.
55. Randhawa PS. Lymphocyte subsets in granulomas of human tuberculosis: an in situ immunofluorescence study using monoclonal antibodies. *Pathology* 1990;22:153-155.
56. Muller I, Cobbold SP, Waldmann H, Kaufmann SH. Impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection after selective in vivo depletion of L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *Infect Immunol* 1987;55:2037-2041.
57. Teitelbaum R, Glatman-Freedman A, Chen B, Robbins JB, Unanue E, Casadevall A, et al. A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15688-15693.
58. Tascon RE, Stavropoulos E, Lukacs KV, Colston MJ. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by CD8(+) cells requires production of gamma interferon. *Infect Immun* 1998;66:830-834.
59. Caruso AM, Serbina N, Klein E, Triebold K, Bloom BR, Flynn JL. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *J Immunol* 1999;162:5407-5416.
60. Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, Schoenbaum EE, Vermund SH, Klein RS, et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *New Engl J Med* 1989;320:545-550.
61. Oddo M, Renno T, Attainger A, Bakker T, MacDonald HR, Meylan PR. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1998;160:5448-5454.
62. Scanga CA, Mohan VP, Yu K, Joseph H, Tanaka K, Chan J, et al. Depletion of CD4(+) cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. *J Exp Med* 2000;192:347-358.
63. Clarke SRM. The critical role of CD40/CD40L in the CD4-dependent generation of CD8+ cell immunity. *J Leukoc Biol* 2000;67:607-614.
64. Andreasen SO, Christensen J, Marker O, Thomsen AR. Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses. *J Immunol* 2000;164:3689-3697.
65. Kalams SA, Walker BD. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 1998;188:2199-2204.
66. Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold HG. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2 resulting in inactivation of TNF-alpha. *J Immunol* 1998;161:2636-2641.
67. Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, et al. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun* 1997;65:298-304.
68. Silva CL, Lowrie DB. Identification and characterization of murine cytotoxic T cells that kill *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2000;68:3269-3274.
69. Mazzaccaro RJ, Gedde M, Jensen ER, van Santen HM, Ploegh HL, Rock KL, et al. Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11786-11791.
70. Hmama Z, Gabathuler R, Jefferies WA, DeJong G, Reiner NE. Attenuation of HLA_DR expression by mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers. *J Immunol* 1998;161:4882-4893.
71. Stenger S, Niazi KR, Modlin RL. Down-regulation of CD1 on antigen presenting cells by infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1998;161:3582-3588.
72. McDonough KA, Kress Y, Bloom BR. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect Immun* 1993;61:2763-2773.
73. Lalvani A, Brookes R, Wilkinson R, Malin A, Pathan A, Andersen P, et al. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:270-275.
74. De Libero G, Flesch I, Kaufmann SH. *Mycobacteria*-reactive Lyt-2+ T cell lines. *Eur J Immunol* 1988;18:59-66.
75. Albert M, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class-I restricted CTLs. *Nature* 1998;392:86-89.
76. Serbina NV, Flynn JL. Early emergence of CD8(+) T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun* 1999;67:3980-3988.
77. Zhu X, Stauss HJ, Ivanyi J, Vordermeier HM. Specificity of CD8+ T cells from subunit-vaccinated and infected H-2b mice recognizing the 38 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int Immunol* 1997;9:1669-1676.
78. Sieling PA, Ochoa MT, Jullien D, Leslie DS, Sabet S, Rosat JP, et al. Evidence for human CD4+ T cells in the CD1-restricted repertoire: derivation of mycobacteria-reactive T cells from leprosy lesions. *J Immunol* 2000;164:4790-4796.
79. Mohagheghpour N, Gammon D, Kawamura LM, van Vollenhoven A, Benike CJ, Engleman EG. CTL response to *Mycobacterium tuberculosis*: identification of an immunogenic epitope in the 19kDa lipoprotein. *J Immunol* 1998;161:2400-2406.
80. Teitelbaum R, Cammer M, Maitland ML, Freitag NE, Condeelis J, Bloom BR. *Mycobacterial* infection of macrophages results in membrane-permeable phagosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:15190-15195.
81. Sugita M, Grant EP, van Donselaar E, Hsu VS, Rogers RA, Peters PJ, et al. Separate pathways for antigen presentation by CD1 molecules. *Immunity* 1999;11:743-752.
82. Schaible UE, Hagens K, Fischer K, Collins HL, Kaufmann SH. Intersection of Group 1 CD1 molecules and mycobacteria in different intracellular compartments of dendritic cells. *J Immunol* 2000;164:4843-4852.

83. Briken V, Jackman RM, Watts GF, Rogers RA, Porcelli SA. *Human CD1b and CD1c isoforms survey different intracellular compartments for the presentation of microbial lipid antigens*. J Exp Med 2000;192:281-287.

84. Beatty WL, Rhoades ER, Ullrich HJ, Chatterjee D, Heuser JE, Russell DG. *Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages*. Traffic 2000;1:235-247.

85. Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB. *Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta + T cells*. Nature 1994;372:691-694.

86. Porcelli A, Morita CT, Brenner MB. *CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen*. Nature 1992;360:593-587.

87. Moody DB, Ulrichs T, Muhlecker W, Young DC, Gurcha SS, Grant E, et al. *CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in Mycobacterium tuberculosis infection*. Nature 2000;404:884-888.

88. Sieling PA, Jullien D, Dahlem M, Tedder TF, Rea TH, Modlin RL, et al. *CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity*. J Immunol 1999;162:1851-1858.

89. Kaufmann SH. *T lymphocytes in intracellular microbial infections*. Immunol Today 1988;9:168-174.

90. Kaufmann SHE. *Immunity to intracellular bacteria*. Annu Rev Immunol 1993;11:129-163.

91. Ho S, Mehra V, Thoma-Uzynski S, Stenger S, Serbina N, Mazzaccaro RJ, et al. *Antimicrobial activity of MHC class I restricted CD8 + T cells in human tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:12210-12215.

92. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, et al. *An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin*. Science 1998;282:121-125.

93. Laochumroonvorapong P, Wang J, Liu CC, Ye W, Moreira AL, Elkorn KB, et al. *Perforin, a cytotoxic molecule which mediates cell necrosis, is not required for the early control of mycobacterial infection in mice*. Infect Immun 1997;65: 127-132.

94. Matloubian M, Suresh M, Glass A, Galvan M, Chow K, Whitmire JK, et al. *A role for perforin in downregulating T-cell responses during chronic viral infection*. J Virol 1999;73:2527-2536.

95. Johnson CM, Cooper AM, Frank AA, Orme IM. *Adequate expression of protective immunity in the absence of granuloma formation in Mycobacterium tuberculosis-infected mice with a disruption in the intracellular adhesion molecule 1 gene*. Infect Immun 1998;66:1666-1670.

96. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'ambrosio D, Lang R, Borsig A, et al. *Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s*. J Exp Med 1998;187:129-134.

97. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. *The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses*. Annu Rev Immunol 2000;18:593-620.

98. Orme IM, Cooper AM. *Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis*. Immunol Today 1999;20:307-312.

99. Rhoades ER, Cooper AM, Orme IM. *Chemokine response in mice infected with Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 1995;63:3871-3877.

100. Ellner JJ, Hirsch CS, Whalen CC. *Correlates of protective immunity to Mycobacterium tuberculosis in humans*. Clin Infect Dis 2000;30 Suppl 3:S279-S282.

101. Streeton JA, Desem N, Jones SL. *Sensitivity and specificity of a gamma interferon blood test for tuberculosis infection*. Int J Tuberc Lung Dis 1998;2:443-450.

102. Demissie A, Ravn P, Olobo J, Doherty TM, Eguale T, Geletu M, et al. *T-cell recognition of Mycobacterium tuberculosis culture filtrate fractions in tuberculosis patients and their household contacts*. Infect Immun 1999;67:5967-5971.

103. Schwander SK, Torres M, Carranza CC, Escobedo D, Tary-Lehmann M, Anderson P, 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;165:1479-1485.

104. Vakemans J, Lienhardt C, Sillah JS, Wheeler JG, Lahai GP, Doherty MT, et al. *Tuberculosis contacts but not patients have higher gamma interferon responses to ESAT-6 than do community controls in The Gambia*. Infect Immun 2001; 69:6554-6557.

105. Fjallbrant H, Ridell M, Larsson LO. *The tuberculin skin test in reaction to immunological in vitro reactions in BCG vaccinated healthcare workers*. Eur Respir J 2001;18:376-380.

106. Katial RK, Hershey J, Purohit-Seth T, Belisle JT, Brennan PJ, Spencer JS, et al. *Cell-mediated immune response to tuberculosis antigens: comparison of skin testing and measurement of in vitro gamma interferon production in whole-blood culture*. Clin Diagn Lab Immunol 2001;8:339-345.

107. Brock I, Munk ME, Kok-Jensen A, Andersen P. *Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10*. Int J Tuberc Lung Dis 2001;5:462-267.

108. Converse PJ, Jones SL, Astemborski J, Vlahov D, Graham NM. *Comparison of a tuberculin interferon-gamma assay with the tuberculin skin test in high-risk adults. Effect of human immunodeficiency virus infection*. J Infect Dis 1997; 176:144-150.