

La producción de granzima B e interferón gamma por linfocitos T infectados con *Mycobacterium tuberculosis in vitro*

Claudia Carranza,* Esmeralda Juárez,* Ma. del Carmen Sarabia,* Dante Escobedo,‡ Eduardo Sada,* Martha Torres* ✉

Departamento de Investigación en Microbiología, INER,* Servicio de Broncoscopía, INER‡
Trabajo recibido: 14-VII-2010; aceptado: 05-XI-2010

RESUMEN. Antecedentes: Las moléculas citotóxicas efectoras como granzima B (GrB), participan en la respuesta de defensa ante la infección por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*); sin embargo, su participación en el control de la infección con *M. tuberculosis* en el humano, aún no ha sido bien estudiada.

Métodos: Se determinó la producción de GrB e IFN γ utilizando el ensayo de ELISPOT en células mononucleares de sangre periférica y en células bronquioloalveolares (CBA) de sujetos sanos PPD+ y PPD-, infectadas *in vitro* con las cepas *M. tuberculosis* H37Ra y H37Rv. La activación celular se determinó mediante citometría de flujo.

Resultados: La infección por *M. tuberculosis*, o la estimulación con PPD, induce la producción de IFN γ por células mononucleares y por CBA de individuos PPD+ y PPD-. Esta producción se vio incrementada en sujetos con previa exposición a *M. tuberculosis*. La frecuencia de células productoras de GrB fue baja en ambos grupos en comparación con IFN γ .

Conclusiones: La producción específica de IFN γ se encuentra incrementada en las CBA de los individuos PPD+. Lo cual sugiere que en individuos con una exposición previa a *M. tuberculosis* se induce una respuesta inmune adquirida con reclutamiento al pulmón de células Ags-específicas y que esta respuesta no incluye a los mecanismos citotóxicos como GrB. Es posible que la determinación de IFN γ por ELISPOT en células broncoalveolares sea útil para el estudio de marcadores de protección en la tuberculosis pulmonar.

Palabras clave: Granzima B, interferón gamma, *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT. Background: The effectors cytotoxic molecules like granzima B (GrB), participate in the defense at the infection by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), nevertheless, has not been studied their participation in the control of the infection with *M. tuberculosis* in the human.

Methods: The production of GrB and IFN γ in mononuclear cells of peripheral blood cells and bronchoalveolar cells from healthy donors PPD+ and PPD- was assessed by ELISPOT and cellular activation was analyzed by FACS.

Results: *M. tuberculosis*, and PPD, induces the IFN γ production by mononuclear cells and bronchoalveolar cells. The frequency of producing cells of GrB in mononuclear and bronchoalveolar cells was low when comparing itself with the producing cells of IFN γ .

Conclusions: The frequency of producing cells of IFN- γ was higher in mononuclear and bronchoalveolar cells from healthy donors PPD+ in comparison with PPD-. In contrast the frequency of producing cells of GrB was low and comparable in both groups. These results suggest that the previous exposition to *M. tuberculosis* induces the activation of the acquired mechanisms as IFN- γ without the participation of cytotoxic mechanisms. The determination of IFN- γ by ELISPOT could be a useful biomarker to the study of immune protection in human tuberculosis.

Key words: Granzima B, interferon gamma, *Mycobacterium tuberculosis*.

INTRODUCCIÓN

La infección por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) ocurre principalmente por la vía aérea a través de la inhalación de las micobacterias. En respuesta a la infección por *M. tuberculosis* se desarrolla una respuesta inmune adquirida capaz de limitar la replicación de las bacterias,¹ la mayoría de los individuos son capaces de controlar y limitar la infección primaria, evitando así el desarrollo de la enfermedad.

El desarrollo de una respuesta inmune protectora hacia *M. tuberculosis* requiere de una compleja red de interacciones celulares que se da principalmente entre macrófagos alveolares (MA) y linfocitos T. Después de fagocitar a *M. tuberculosis*, los MA inician el procesamiento de antígenos (Ags) bacterianos, los cuales son presentados a los linfocitos TCD4+ y TCD8+.²

Los linfocitos TCD4+ producen citocinas como TNF, IL6, IL4 e interferón gamma (IFN γ). El IFN γ juega un

papel importante en el control de la tuberculosis, tanto en humanos como en modelos animales.²⁻⁶ Por su parte, los linfocitos TCD8+, realizan dos tipos de funciones efectoras, la producción de citocinas y la lisis de las células infectadas mediante la liberación de proteínas citolíticas como las perforinas, granzimas (GrB), que comprende a proteínas de la familia de las proteasas de serina y las granzimas.⁷

Nuestro grupo ha reportado que en voluntarios sanos con exposición previa a *M. tuberculosis* existe una producción antígeno-específica de INF γ por las células bronquioloalveolares (CBA), Schwander, *et ál.*⁸ Posteriormente, se ha reportado que los linfocitos TCD8+ y TCD4+ contribuyen de manera importante al control del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en MA infectados y que esta actividad correlaciona directamente con la mayor producción de INF γ .⁹

Por otro lado, en sangre periférica de humanos se han observado poblaciones de células TCD4+ y TCD8+ con actividad citotóxica hacia *M. tuberculosis* cuyo efecto micobactericida se realiza a través de la destrucción (lisis) o muerte celular programada (apoptosis) de los macrófagos infectados.¹⁰⁻¹³

Con el propósito de definir los mecanismos de colaboración linfocito-macrófago en un contexto de infección *in vitro* con *M. tuberculosis*, en el presente trabajo se estudió la producción de las citocinas activadoras de macrófagos medida por la liberación de INF γ y la actividad citotóxica medida por la liberación de la molécula citotóxica GrB.

MATERIAL Y MÉTODOS

Grupos de estudio

Fueron incluidos en el estudio 11 sujetos sanos (8 hombres, 3 mujeres). Las edades fluctuaron entre los 45 y 24 años, la media de edad para ambos grupos fue de 32 años. Los voluntarios se reclutaron en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER), se les explicó su participación en el estudio y estuvieron dispuestos a firmar su consentimiento informado por escrito. Este proyecto fue aprobado por el comité de ética del INER.

Los voluntarios fueron seronegativos para el virus de la inmunodeficiencia humana. A todos se les realizó estudios de laboratorio clínicos y aplicó PPD (prueba intradérmica, derivado proteico purificado de *M. tuberculosis*). De los sujetos seleccionados, 5 fueron PPD+ y 6 fueron PPD- y a cada uno se les realizó un lavado bronquioloalveolar (LBA) en el Servicio de Broncoscopia del INER y se les tomó una muestra de sangre de 180 mL.

Lavado bronquioloalveolar

Para obtener las CBA se realizó una broncoscopia a los sujetos incluidos en el estudio, como previamente se describe.⁸ Brevemente, el LBA se realizó en dos segmentos del lóbulo medio del pulmón, instilando un volumen total de 300 mL de solución salina. El LBA fue centrifugado a 1,200 rpm, por 15 min a 4°C, para obtener las CBA. Las CBA fueron resuspendidas a una concentración de 1.5×10^5 células/mL en medio de cultivo RPMI-1640 (BioWhittaker, Walkersville, MD) suplementado con 50 μ g/mL de sulfato de gentamicina, 200 mM L-glutamina y 10% de suero humano inactivado (SH).

Preparación de células mononucleares de sangre periférica

La sangre periférica se diluyó a una relación 1:1 con RPMI-1640, las células mononucleares de sangre periférica (CMN) fueron separadas por centrifugación sobre Ficoll-Hypaque (sigma) a una relación 1:3 (Ficoll- dilución de sangre), a una velocidad de 1,200 rpm, durante 45 min a 18°C. Las CMN fueron recuperadas de la interfase, lavadas dos veces con RPMI-1640. Las células se resuspendieron a una concentración 1.5×10^5 células/mL en medio de cultivo RPMI-1640 -10% SH.

Preparación de M. tuberculosis H37Ra y H37Rv para la infección in vitro

Las cepas tipo *M. tuberculosis* H37Ra y *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC, Manassas, VA) fueron crecidas en medio líquido 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, MI), suplementado con 10% de ADC (albúmina, dextrosa y catalasa, Difco) y 2% de glicerol. A los 21 días de crecimiento las bacterias se cosecharon, se determinó su concentración por la técnica de cuentas de unidades formadoras de colonias y se almacenaron en alícuotas a -80°C hasta su uso.

Para cada experimento se descongeló una alícuota de ambas cepas, virulenta y avirulenta (*M. tuberculosis* H37Rv y Ra). Para evitar los aglomerados bacterianos, las bacterias se disgregaron por agitación en vortex con perlas de cristal de 3 mm de diámetro durante 5 min, los aglomerados se eliminaron por centrifugación a 2,000 rpm durante 5 min y del sobrenadante se ajustaron las bacterias a una concentración 1×10^7 de unidades formadoras de colonias (UFC) para ser utilizadas en cada ensayo.

Ensayo de ELISpot

El ensayo de ELISpot determina la frecuencia de células productoras de citocinas a nivel de una célula. Utilizando

esta técnica se determinó la frecuencia de las células productoras de GrB y de IFN γ en las CBA y en las células mononucleares (Schwander, 2000). Brevemente, placas para ELISPOT de 96 pozos (MultiScreen, Millipore) fueron sensibilizadas con el anticuerpo (Ab) primario para GrB (Hozel, DIAC-NOSTIKA) a 2 μ g/mL o para IFN γ (Endogene, Woburn, MA) a 4 μ g/mL, se incubaron a 4°C durante toda la noche. Las placas fueron lavadas y bloqueadas por 2 h con PBS (Lonza, Walkersville, MD) al 2% albúmina sérica bovina (ASB) (Calbiochem, USA). Se agregaron las CBA y las CMN a una concentración de 1.5 x 10⁵ por pozo y se estimularon con PPD (Staten Serum Institut, Copenhagen, Denmark) 20 μ g/mL, PHA (sigma) y con *M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* H37 Ra a la multiplicidad de infección (MOI) 0.1, 1 y 10 bacterias/célula, las células sin estímulo se usaron como control negativo. Las placas se incubaron a 37°C, 5% CO₂, por 24 h. Las células se lisaron y se agregaron los Abs secundarios para GrB (1 μ g/mL) y para IFN γ (2 μ g/mL), las placas fueron incubadas a 4°C durante la noche. Se agregó el conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Dako, Glostrup, Denmark) a una dilución 1:2000 y las unidades formadoras de puntos (UFP) se visualizaron con 3-amino-9-etilcarbazol (Pierce, Rockford, IL) al 1%. La frecuencia de células productoras de GrB e IFN γ en cada pozo se analizó utilizando un analizador de imágenes ImmunoSpot (Cellular Technology).

Análisis de marcadores de superficie por citometría de flujo

Las subpoblaciones linfocitarias presentes en las CBA y de las CMN se determinaron por citometría de flujo (FACS). Brevemente, 2 x 10⁵ células se tiñeron agregando 2.5 μ L de cada uno de los siguientes anticuerpos: anti-CD3+, anti-CD4+, anti-CD8+, anti-CD56+ y anti-CD69+, acoplados a FITC, PE y PerCP (Becton Dickinson, San José, CA) en combinaciones que permitieron la determinación de tres marcadores por tinción. Las células se incubaron por 20 min a TA, se lavaron y fijaron con paraformaldehído al 1%, se almacenaron a 4°C hasta su adquisición en el citómetro FACScalibur (Becton Dickinson). En cada caso se incluyeron los controles de isotipo correspondientes. Los datos se analizaron con el programa CELL-Quest (Becton Dickinson).

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba Mann-Whitney para comparar entre grupos de PPD y la suma de rangos de Wilcoxon para comparación entre estímulos. Se consideró significancia estadística cuando $p < 0.05$. Se usó el programa SPSS14 (Mapinfo, NY).

RESULTADOS

Producción de granzima B por células mononucleares de sangre periférica y células bronquioloalveolares

No se observaron diferencias en la producción de GrB en los CMN y en CBA, en respuesta a la infección con *M. tuberculosis* H37Ra y *M. tuberculosis* H37Rv.

Las medianas de las UFP por cada 1.5 x 10⁵ CMN fueron para medio 4 y 2, para PPD 10 y 4 UFP, para *M. tuberculosis* H37Ra en la relación de infección 1:1, fueron 8.5 y 5 UFP; en la relación de infección 10:1, resultaron 15 y 85 UFP. En la infección con la cepa virulenta H37 Rv, las UFP en la infección 1:1, resultaron 11 y 4 UFP, finalmente 17 y 111 UFP en la relación de infección 10:1, PPD negativo y positivo, respectivamente (figura 1a).

Para las CBA las medianas de las UFP fueron para medio 6.5 y 3, para PPD 8 y 37; en la infección 1:1 con la cepa avirulenta las UFP fueron 13 y 21.5; en la relación de infección 10:1, se produjo 36.5 y 8 UFP. En la infección con *M. tuberculosis* H37 Rv en la relación de infección 1:1 dio 8 y 32 UFP, y finalmente 5 y 70 UFP en la infección 10:1, PPD negativo y PPD positivo, respectivamente (figura 1b).

No se obtuvo diferencias significativas en ambos tipos de células, ni entre estímulos, ni por el estatus del PPD (figura 1).

La producción de IFN γ entre los grupos de PPD

La frecuencia de las células productoras de IFN γ en las CMN se vio altamente incrementada en los sujetos PPD+ en relación con los sujetos PPD-, en respuesta a PPD y *M. tuberculosis* H37 Ra y Rv (figura 2a). Los resultados sólo mostraron diferencias significativas en la respuesta a PPD (26,349 UFP), en la infección con la cepa H37Ra (33.5, 205 UFP) y con H37Rv (25, 124 UFP) a una relación de infección 1:1 ($p < 0.05$, U Mann-Whitney).

Con respecto a la producción de IFN γ en los CBA, los resultados mostraron una baja frecuencia de células productoras de IFN γ en los sujetos PPD- al compararse con la producción de IFN γ por las CBA de los sujetos PPD+ (figura 2b). Los resultados mostraron una diferencia significativa en relación al control negativo (medio) 2 UFP en los siguientes estímulos: PPD 193 UFP; con la cepa *M. tuberculosis* H37Ra en la relación de infección 1:1 y 10:1 (170- 121 UFP) y en la infección con *M. tuberculosis* H37Rv para ambas relaciones de infección, 174 y 218 UFP (mediana de las UFP) $p < 0.05$ suma de rangos de Wilcoxon.

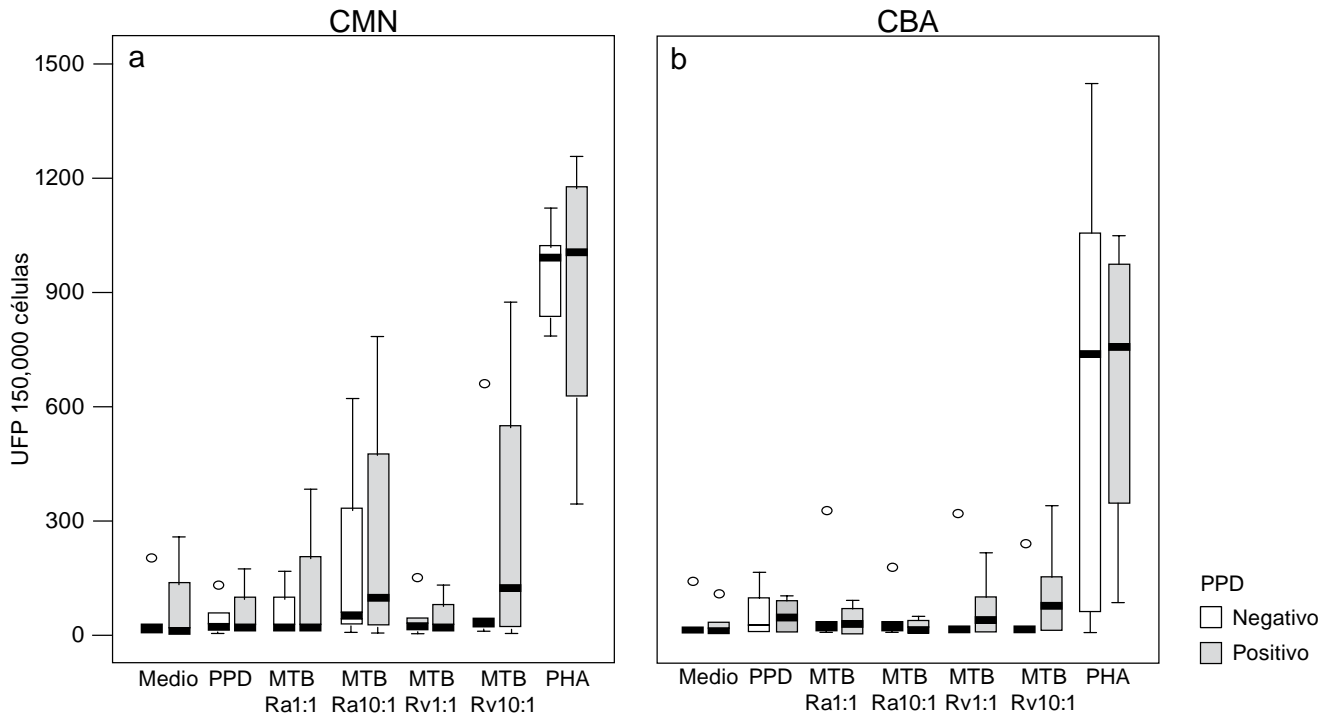


Figura 1. Frecuencia de células productoras de GrB por CMN y por CBA, en respuesta a la estimulación con PPD y a la infección con *M. tuberculosis H37Ra* y *Rv*. La producción de GrB fue determinada por ELIspot y se expresó en UFP por cada 1.5⁵ CMN y/o CBA. Las CMN (a) y CBA (b) fueron estimuladas con *M. tuberculosis H37Ra/Rv* a dos razones de infección 1:1 y 10:1.

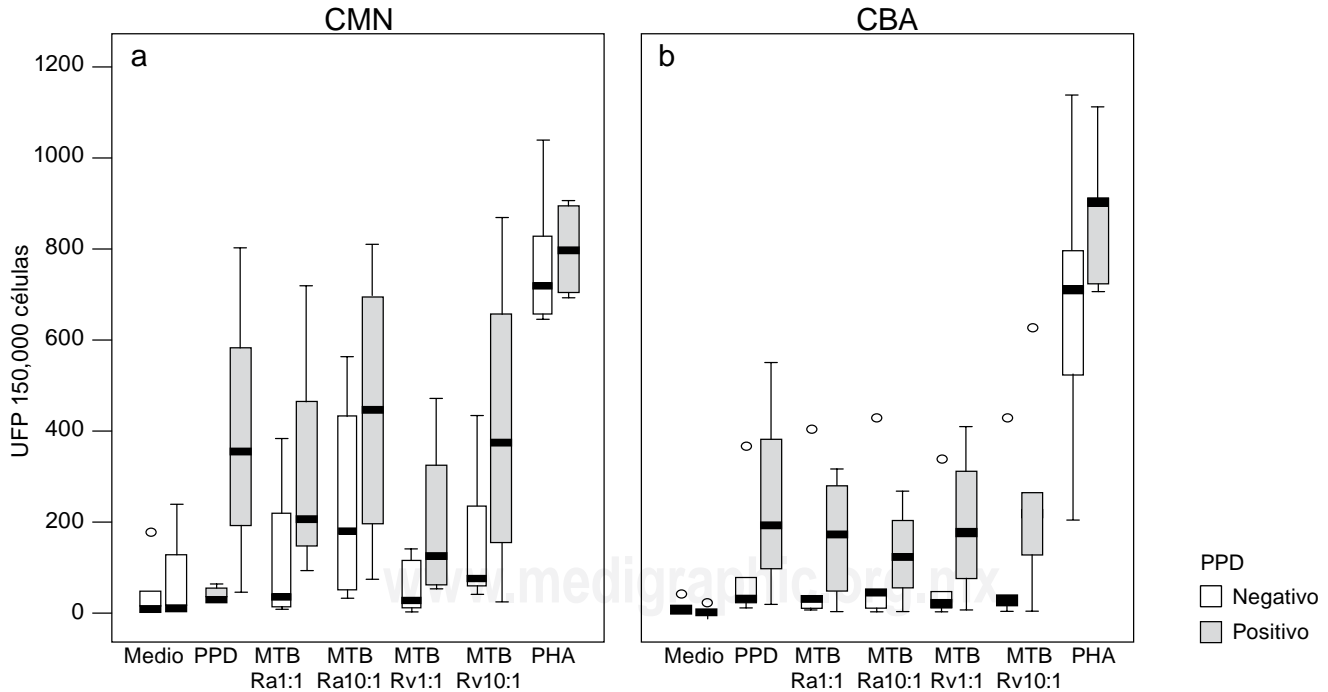


Figura 2. Frecuencia de células productoras de INF γ en cultivos de CMN y CBA, en respuesta a la estimulación con PPD y a la infección con *M. tuberculosis H37Ra* y *Rv*. La producción de INF γ fue determinada por ELIspot, la producción de INF γ se expresó en UFP por 1.5⁵ por CMN y CBA. Las CMN (a) y CBA (b) estudiadas fueron estimuladas con *M. tuberculosis H37Ra/Rv* a dos razones de infección 1:1 y 10:1. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio PPD+ vs. PPD-.

Subpoblaciones celulares de linfocitos T en células mononucleares de sangre periférica y en células bronquioloalveolares

Al analizar las subpoblaciones de las CMN y de las CBA obtenidas utilizando citometría de flujo, se observó que no hay diferencia en los porcentajes de linfocitos TCD3+, TCD4+, TCD8+ y NK totales en las CMN en ambos grupos de estudios PPD+ y PPD-. En relación con las subpoblaciones de linfocitos T en las CBA tampoco se encontró diferencias significativas entre los sujetos PPD+ y PPD-.

Al analizar la activación de los linfocitos T en CMN y CBA se encontró que los linfocitos T de las CBA están activados (tabla 1), tanto en los individuos PPD+ (35.06%) como en PPD- (41.17%), pero esta activación no se observó en los linfocitos T en las CMN de los sujetos PPD- (0.48%) y PPD+ (0.77%).

DISCUSIÓN

El control o desarrollo de la primoinfección por *M. tuberculosis* es compartimentalizado en los pulmones, es por eso que el estudio *in vitro* con CBA nos da una aproximación a la respuesta inmune innata contra *M. tuberculosis* en el sitio de infección.

Así, el propósito de nuestro trabajo fue evaluar la producción de GrB y de IFN γ en cultivos *in vitro* de CMN y de CBA obtenidas de sujetos sanos expuestos a *M. tuberculosis* (PPD+) y de sujetos sanos sin exposición (PPD-).

Nuestros resultados muestran que la producción de GrB en CMN y las CBA, tanto en sujetos PPD+ y PPD- es baja y no muestra diferencias significativas entre los

grupos. Estos datos indican que la vía granulocitotóxica no está activa en los individuos previamente expuestos a *M. tuberculosis* (PPD+). Se conoce que la activación de esta vía es de manera temprana, y que las células NK y los linfocitos TCD8+ son las principales células efectoras productoras de GrB, las células NK presentan los gránulos citotóxicos preformados y actúan en minutos ante la infección, los linfocitos TCD8+ requieren ser activados para sintetizar las moléculas citotóxicas, este proceso requiere de 1 a 3 días durante el cual se diferencian a células efectoras.⁷ Nuestros resultados nos hacen suponer que la baja producción de GrB se debió a que la mayoría de las células T citotóxicas respondieron de manera Ags-específica, es decir, (respuesta adquirida) ante la infección con *M. tuberculosis*.

En relación con la producción de IFN γ se observó una alta frecuencia de células productoras de IFN γ , tanto en CMN como en CBA. Esta respuesta se incrementó en los sujetos con previa exposición a *M. tuberculosis* (PPD+), tanto en CMN como en los CBA aunque la respuesta en las CBA fue mayor. Lo cual sugiere que las células Ags-específicas son reclutadas al pulmón en individuos con una exposición previa y continua a *M. tuberculosis*.

La producción de las moléculas citotóxicas como la GrB ocurre en la fase temprana en la infección con *M. tuberculosis*.^{14,15} Es muy probable que la población de individuos PPD+ incluida en este estudio haya tenido exposición previa y continua a *M. tuberculosis* que se asocia a la alta prevalencia de infección en nuestro país.¹⁶ Pero precisamente por esta exposición en la comunidad con *M. tuberculosis* es entendible que las CBA de los sujetos PPD+ reconozcan antígenos micobacterianos en cultivos *in vitro* y produzcan IFN γ en forma específica.

Tabla 1. Poblaciones linfocitarias de células mononucleares de sangre periférica y células bronquioloalveolares.

	PPD-		PPD+	
	CMN	CBA	CMN	CBA
Linfocitos totales				
Linfocitos CD3+	53.10 \pm 2.40	11.1 \pm 4.4	54.60 \pm 2.90	17.70 \pm 4.6
LT activados (CD3+CD69+)	0.48 \pm 0.26	41.7 \pm 15.2	0.77 \pm 0.33	35.06 \pm 10.2
Subpoblaciones de linfocitos				
T CD4+	41.2 \pm 2.2	37.3 \pm 6.3	43.5 \pm 5.9	49.3 \pm 4.6
T CD8+	21.5 \pm 2.5	38.41 \pm 10.2	27.2 \pm 3.9	27.5 \pm 5.2
NK	25.6 \pm 6.4	11.1 \pm 2.1	25.4 \pm 4.0	11.3 \pm 3.01
Subpoblaciones de células NK				
NK-CD3+	28.4 \pm 7.0	76.7 \pm 6.6	28.6 \pm 6.2	67.9 \pm 6.7
NK-CD3-	71.7 \pm 7.0	23.2 \pm 6.6	71.3 \pm 6.2	32.0 \pm 6.7

Porcentaje de células, se presenta la media \pm error estándar.

CMN: células mononucleares de sangre periférica; CBA: células bronquioloalveolares.

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Schwander, *et ál*⁸ donde se demostró que las CBA obtenidas de sujetos expuestos a *M. tuberculosis*, al ser estimuladas con los Ags de *M. tuberculosis* producen más INF γ que las CMN autólogas.

Por otro lado, al estudiar las subpoblaciones de linfocitos T en las CMN y CBA no se encontró diferencia entre el porcentaje de linfocitos TCD3+, TCD4+, TCD8+ y NK, al comparar el grupo de los sujetos PPD+ y los sujetos PPD-. Sin embargo, sí se encontró un incremento de la expresión de CD69+ en las células de los individuos PPD+ (tabla 1).

Los resultados sugieren una compartimentalización en el pulmón de células antígeno-específicas debido a la continua exposición a *M. tuberculosis* y por esta razón las CBA están activadas y producen INF γ en respuesta a la estimulación con *M. tuberculosis*.

Limitaciones del estudio

El trabajo con CBA nos puede explicar los fenómenos que se llevan a cabo en el sitio de la infección; pero a la vez, es una tarea con limitantes asociadas a la imposibilidad de contar con un grupo de estudio mayor y en el número limitado de células para realizar los ensayos.

CONCLUSIÓN

La vía granulocitotóxica no está activa en los individuos previamente expuestos a *M. tuberculosis* (PPD+). Sin embargo, la producción específica de INF γ se encuentra incrementada en las CBA de sujetos PPD+. Lo cual sugiere que las células Ags-específicas son reclutadas al pulmón en individuos con una exposición previa y continua a *M. tuberculosis*. Es posible que la determinación de INF γ en CBA sea útil para el estudio de marcadores de protección en la tuberculosis pulmonar.

REFERENCIAS

1. Sepkowitz KA. *How contagious is tuberculosis?* Clin Infect Dis 1996;23:954-962.
2. Flynn JL, Chan J. *Immunology of tuberculosis.* Annu Rev Immunol 2001;19:93-129.
3. Giacomini E, Iona E, Ferroni L, *et ál.* *Infection of human macrophages and dendritic cells with Mycobacterium tuberculosis induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response.* J Immunol 2001;166:7033-7041.
4. Torres M, Herrera T, Villareal H, Rich E, Sada E. *Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis.* Infect Immun 1998;66:176-180.
5. Caruso A, Serbina N, Klein E, Triebold K, Bloom B, Flynn J. *Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of INF- γ , yet succumb to tuberculosis.* J Immunol 1999;162:5407-5416.
6. Flynn J, Chan J, Triebold K, Dalton D, Stewart TA, Bloom BR. *An essential role for IFN - γ in resistance to Mycobacterium tuberculosis.* J Exp Med 1993;178: 2249-2251.
7. Russell JH, Ley TJ. *Lymphocyte-mediated cytotoxicity.* Annu Rev Immunol 2002;20:323-370.
8. Schwander S, Torres M, Carranza C, *et ál.* *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.
9. Carranza C, Juárez E, Torres M, Ellner J, Sada E, Schwander SK. *Mycobacterium tuberculosis growth control by lung macrophages and CD8 cells from patient contacts.* Am J Respir Crit Care Med 2006;173:238-245.
10. Tan JS, Canaday DH, Boom WH, Balaji KN, Schwander SK, Rich EA. *Human alveolar T lymphocyte responses to Mycobacterium tuberculosis antigens: role for CD4+ and CD8+ cytotoxic T cells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis.* J Immunol 1997;159:290-297.
11. Brookes RH, Pathan AA, McShane H, Hensmann M, Price DA, Hill AV. *CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular Mycobacterium tuberculosis growth in activated human macrophages.* Eur J Immunol 2003;33:3293-3302.
12. Serbina NV, Lazarevic V, Flynn JL. *CD4(+) T cells are required for the development of cytotoxic CD8(+) T cells during Mycobacterium tuberculosis infection.* J Immunol 2001;167:6991-7000.
13. Pathan AA, Wilkinson KA, Wilkinson RJ, *et ál.* *High frequencies of circulating IFN-gamma-secreting CD8 cytotoxic T cells specific for a novel MHC class I-restricted Mycobacterium tuberculosis epitope in M. tuberculosis-infected subjects without disease.* Eur J Immunol 2000;30:2713-2721.
14. Bachmann MF, Barner M, Viola A, Kopf M. *Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection.* Eur J Immunol 1999;29:291-299.
15. Wherry EJ, Teichgräber V, Becker TC, *et ál.* *Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets.* Nat Immunol 2003;4:225-234.
16. García-García ML, Small PM, García-Sancho C, *et ál.* *Tuberculosis epidemiology and control in Veracruz, Mexico.* Int J Epidemiol 1999;28:135-140.

✉ Correspondencia:

Dra. Martha Torres,
Departamento de Investigación en Microbiología,
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Ismael Cosío Villegas. Calzada de Tlalpan 4502,
colonia Sección XVI. México, D.F., 14080
Correo electrónico: marthatorres98@yahoo.com

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.