



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## FACULTAD DE MEDICINA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA POR LINFOCITOS T  
CD8+ CD57+ EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR

### T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
(INMUNOLOGIA)  
PRESENTA:  
M. EN C. ISABEL SADA OVALLE

MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica de la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) en colaboración con la Unidad de Atención e Investigación en Tuberculosis del INER y con el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Esta tesis doctoral fue dirigida por el Dr. Ricardo Lascurain Ledesma.

## AGRADECIMIENTOS

A los doctores Ricardo Lascurain, Iris Estrada y Edgar Zenteno por su invaluable colaboración en la realización de esta tesis doctoral.

Al Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, en donde se llevo a cabo la mayor parte del trabajo experimental.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca doctoral que me fue otorgada.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Coordinación de Investigación en Salud del Centro Medico Nacional Siglo XXI, IMSS, por la aportaciones brindadas para la realización de este trabajo.

A la Sociedad Mexicana de neumología y Cirugía de Tórax por la beca que me fue otorgada como Investigador Joven.

## DEDICATORIA

A mi padre Dios, por esta oportunidad.

A Luis mi paciente esposo, Fer y Carlitos mis dos regalos, por compartir conmigo todos los días del doctorado.

A mis dos mejores amigas, Rosario y Paty; que siempre me apoyaron para seguir adelante.

A mis padres y mis hermanos.

# REGULACION DE LA RESPUESTA INMUNE POR LINFOCITOS T CD8+ CD57+ EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR

## INDICE

<b>Resumen</b>	.....	<b>6</b>
<b>Introducción</b>	.....	<b>8</b>
<b>Justificación</b>	.....	<b>15</b>
<b>Hipótesis</b>	.....	<b>16</b>
<b>Objetivos</b>	.....	<b>16</b>
<b>Pacientes y Métodos</b>	.....	<b>17</b>
<b>Análisis estadístico</b>	.....	<b>18</b>
<b>Resultados</b>	.....	<b>30</b>
<b>Discusión</b>	.....	<b>41</b>
<b>Bibliografía</b>	.....	<b>52</b>

## RESUMEN

La respuesta inmune celular que desarrolla el hospedero contra *Mycobacterium tuberculosis* es mediada por linfocitos T CD4+ y CD8+. La presencia de linfocitos T CD8+ que expresan el marcador de células NK CD57 y su expansión secundaria a la exposición antigénica crónica sugieren que esta subpoblación puede tener una función efectora relevante en patologías como la tuberculosis pulmonar. Con la finalidad de determinar la frecuencia e identificar características fenotípicas y efectoras de los linfocitos T CD8+ que expresan el marcador CD57, se obtuvo sangre venosa de pacientes adultos con tuberculosis pulmonar activa (TB). A partir de la sangre se obtuvieron células mononucleadas por un gradiente de centrifugación diferencial y a su vez, monocitos mediante adherencia celular y linfocitos T CD8+CD57+ a través de inmunomagneto-selección. La expresión de moléculas de membrana o intracelulares en los linfocitos T CD8+, fue determinada por citometría de flujo y la actividad citotóxica fue evaluada por un ensayo colorimétrico. Nuestros resultados mostraron aumento del porcentaje de linfocitos T CD8+CD57+ en el grupo de pacientes con TB comparado con el grupo de individuos sanos ( $p < 0.0001$ ). Esta subpoblación celular se caracterizó por expresión disminuida de las moléculas CD28 y CD62L, así como un incremento en CD44 y CD69, sin expresión de la molécula CD161, ni reconocimiento significativo de  $\alpha$ -galactosilceramida presentada por tetrámeros de CD1d. La estimulación con miristato y acetato de forbol mas ionomicina mostró mayor cantidad de perforina, granzima-A, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en los linfocitos T CD8+CD57+ de pacientes.

Con respecto a la citotoxicidad, solamente los linfocitos T CD8+CD57+ de pacientes mostraron actividad citotóxica espontánea contra los monocitos autólogos. Cuando el ensayo citotóxico se realizó en presencia de antígeno soluble de *Mycobacterium tuberculosis* de la cepa H37Rv, los linfocitos T CD8+CD57+ incrementaron su actividad citotóxica, pero este aumento fue significativamente menor que el mostrado por los linfocitos T CD8+CD57- de los pacientes ( $p < 0.006$ ) o de los individuos sanos ( $p < 0.0005$ ). La adición de anticuerpos contra moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) en los ensayos de citotoxicidad, solamente inhibió la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ de los individuos sanos, independientemente de la expresión de CD57.

Estos resultados demuestran que los linfocitos T CD8+CD57+ son una subpoblación que incrementa su frecuencia en los pacientes con tuberculosis pulmonar y que tiene la capacidad de mediar citotoxicidad ex-vivo en ausencia de estimulación antigénica.



## INTRODUCCION

La tuberculosis, cuyo agente etiológico es *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial ya que genera 1.8 millones de muertes y 8 millones de casos nuevos al año [1]. La respuesta inmune celular que desarrolla el hospedero contra Mtb generalmente es exitosa ya que limita la progresión de la enfermedad, sin embargo, no es lo suficientemente efectiva para lograr la eliminación del bacilo [2]. En esta respuesta inmunológica participan diferentes subpoblaciones linfocitarias. Por un lado, los linfocitos T CD4+ son mediadores centrales de resistencia contra Mtb a través de la producción de citocinas del tipo Th1 como el interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) y el factor alfa de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) [3-5]. El IFN- $\gamma$  es una citocina clave que permite controlar el crecimiento intracelular de Mtb ya que activa de manera eficiente las funciones microbidas de los macrófagos, mientras que el TNF- $\alpha$  favorece la organización y diferenciación celular para la formación del granuloma [6]. Por otra parte, los linfocitos T CD8+ participan en la inmunidad protectora contra Mtb gracias a su capacidad para reconocer y lisar macrófagos infectados además de producir citocinas del tipo Th1 [7, 8]. En el estudio de la tuberculosis, diferentes trabajos experimentales utilizando eliminación de linfocitos T mediada por anticuerpos, transferencia adoptiva de linfocitos T, así como ratones "knockout" que carecen de CD1d o TAP-1 o de linfocitos T CD4+, han generado suficiente evidencia experimental que demuestra que los linfocitos T CD8+ son requeridos para alcanzar una inmunidad óptima contra Mtb [9-11]. La respuesta inmune celular mediada por los linfocitos T CD8+ es desencadenada por eventos de señalización vía receptor de célula T (TCR). La interacción específica de este TCR con el

complejo péptido-molécula de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) resulta en funciones efectoras tales como citólisis y producción de citocinas que son importantes en mediar resistencia por parte del hospedero contra Mtb [12]. Una gran limitante en la actualidad es que pocas de estas funciones han podido ser estudiadas de manera dinámica y directamente en el ser humano.

Entre los mecanismos efectores de los linfocitos T CD8+ que más se han estudiado está la secreción de citocinas, particularmente las citocinas tipo 1 como el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ . Ambas citocinas actúan de manera sinérgica para activar a los macrófagos, lo cual incrementa su actividad microbicida [13]. El TNF- $\alpha$  también ha mostrado mediar un papel importante en la protección contra Mtb. Esto ha sido demostrado en diversos estudios clínicos, en donde los pacientes con artritis reumatoide que recibieron agentes que bloquean al TNF- $\alpha$ , presentaron una mayor incidencia de tuberculosis pulmonar [14]. Estas dos citocinas también tienen otras funciones inmunológicas como incrementar la expresión de las moléculas MHC de clase I y II, así como de CD1d [15]. Diferentes estudios realizados en el modelo murino de tuberculosis han hecho evidente que no todos los linfocitos T CD8+ que son específicos para antígenos de Mtb producen IFN- $\gamma$  [16]. Esta discrepancia puede reflejar la heterogeneidad en la función de los linfocitos T CD8+ antígeno específicos, así como la existencia de distintas subpoblaciones de linfocitos T CD8+ [17].

En este contexto de funciones efectoras de los linfocitos T CD8+, encontramos su habilidad para mediar citotoxicidad celular [18]. La lisis de los macrófagos infectados resulta ser benéfica para el hospedero, cuando las bacterias liberadas son capturadas nuevamente pero por macrófagos activados. Esta

actividad de los linfocitos T CD8+ es mediada por dos mecanismos principales: la vía dependiente de gránulos y el sistema Fas/FasL [7, 19].

Citotoxicidad por la vía dependiente de gránulos: la vía de citotoxicidad dependiente de gránulos se caracteriza por la liberación de perforina, las granzimas y la granulicina. La perforina es una proteína que forma poros en la membrana de la célula blanco, induce su ruptura y eventualmente la muerte. Estos poros que forma la perforina son la puerta de entrada para las granzimas, proteínas que inducen apoptosis en la célula blanco mediante la activación de caspasas [20]. La granulicina, es la primera molécula descrita con actividad microbicida directa sobre Mtb, pertenece a la familia de las proteínas tipo saposina y se localiza en los gránulos citotóxicos de los linfocitos T CD8+ y de las células asesinas naturales (NK) [21].

Citotoxicidad a través del sistema CD95/CD95L (Fas-FasL). El sistema CD95/CD95L es uno de los sistemas apoptóticos mas estudiados. CD95 es una proteína transmembranal que pertenece a la familia de los receptores del TNF que es ampliamente expresada en células blanco [22]. CD95L (CD178) es otra proteína transmembranal de la familia del TNF, su expresión se encuentra incrementada en linfocitos T activados y células NK. Al interaccionar CD95 de las células blanco (por ejemplo macrófagos infectados) con CD95L del linfocito T se activa la vía de apoptosis dependiente de caspasas, principalmente la caspasa 8 [23]. Las caspasas son proteínas con actividad de proteasas que son esenciales para la iniciación y ejecución del proceso apoptótico. Actualmente existen 13 miembros que son clasificados en dos grupos dependiendo de la acción que realizan: a)Inflamatorias: caspasa 1, 4, 5 y 12 y b) apoptóticas: 2, 3, 6, 7, 8, 9 y10) [24].

Para la activación de los linfocitos T CD8+ se requieren dos señales principales, la primera señal es proveída por el reconocimiento de antígenos específicos de naturaleza proteica presentados por las moléculas clase I del MHC en una célula presentadora de antígeno. La segunda señal, llamada “señal coestimuladora” es proveída por las moléculas B7-1/B7-2 en la célula presentadora de antígeno que se unen con CD28 en el linfocito T. En ausencia de coestimulación, los linfocitos T que reconocen antígenos fallan para responder y mueren o entran en un estado de ausencia de respuesta conocido como anergia. Por lo tanto, la coestimulación es un determinante clave de la respuesta de los linfocitos T que han reconocido un antígeno. Sin embargo, es importante mencionar que no todos los linfocitos T requieren de segunda señal, un ejemplo de esto son los linfocitos T CD8+, de los cuales, en los seres humanos cerca del 50% son CD28 negativos [25]. Esta vía de presentación antigénica se encarga de presentar péptidos intracelulares que son procesados por el proteasoma y translocados al retículo endoplásmico gracias a la acción del heterodímero TAP1/TAP2 [26]. Una vez en el retículo endoplásmico, los péptidos son procesados por pequeñas proteasas y ensamblados con la cadena pesada de la molécula clase I y ésta a su vez con la  $\beta$ 2 microglobulina, para formar un complejo trimérico que es transportado a la superficie celular en donde es reconocido por un linfocito T CD8+ específico [27].

Otro grupo de antígenos que puede ser presentado a los linfocitos T, son los antígenos de origen lipídico que se unen a las moléculas CD1 [28]. CD1 es una familia de proteínas que tienen como función presentar antígenos lipídicos a los linfocitos T para activar la respuesta inmune celular [29]. Una vez que las distintas isoformas pertenecientes al grupo 1 (CD1a, CD1b y CD1c) han

presentado lípidos específicos a los linfocitos T pueden contribuir a la defensa del hospedero contra Mtb a través de inducir la producción de citocinas como IFN- $\gamma$ . Estas moléculas del grupo 1 de la familia CD1 son principalmente presentadoras de antígenos derivados de micobacterias patógenas como *Mycobacterium tuberculosis* [30]. En contraste, CD1d, la única isoforma perteneciente al grupo 2 de la familia CD1, ha sido principalmente asociada con la activación de los linfocitos NKT [31]. El término linfocito NKT define a una subpoblación de linfocitos T que comparte algunas características con las células NK, particularmente la expresión del marcador NK1.1 (CD161). Los linfocitos NKT expresan niveles intermedios de un receptor de superficie invariante ( $V\alpha 14$  en el ratón y  $V\alpha 24$ ,  $V\beta 11$  en el humano, pareados con diversos segmentos  $V\beta$ ), que reconoce al glicolípido sintético  $\alpha$ -galactosilceramida presentado por la molécula CD1d y su perfil de secreción de citocinas es TH1/TH2 [15]. En el ser humano estos linfocitos NKT pueden ser CD4+, CD8+ o dobles negativos (DN). De manera reciente, Gadola SD y colaboradores demostraron que existe una proporción de linfocitos T CD8+ que tienen la capacidad de reconocer la  $\alpha$ -galactosilceramida cuando es presentada por tetrámeros o monómeros de CD1d y aunque no se conoce cuál es su ligando natural in vivo consideran que su función puede ser relevante [32]. La activación de estos linfocitos puede modificar la respuesta inmune en diversos procesos patogénicos incluyendo la infección por *Mycobacterium tuberculosis* [33, 34].

Diversos estudios publicados en años recientes han proveído mayor conocimiento en lo que respecta a las vías de presentación antigénica, principalmente enfocados a saber cómo los antígenos que se localizan en los

fagosomas son presentados a los linfocitos T CD8+. Esta vía se ha denominado presentación cruzada de antígenos, ya que antígenos de origen exógeno provenientes principalmente de vesículas apoptóticas derivadas de macrófagos infectados (célula primaria), pueden ser presentados por moléculas clase I a los linfocitos T CD8+ una vez que dichos antígenos han sido transferidos y procesados a una célula presentadora de antígeno secundaria, esencialmente células dendríticas [35, 36]. Actualmente se considera que esta vía es el principal mecanismo para la activación de los linfocitos T CD8+ en infecciones por patógenos intracelulares [37].

Durante varios procesos infecciosos que tienden a la cronicidad como la infección por Mtb, la persistencia de antígenos juega una función primordial en la expansión y diferenciación de subpoblaciones de linfocitos T CD8+ [38]. Varios marcadores de superficie han sido propuestos para identificar estas subpoblaciones. Los más estudiados son CD28 (receptor co-estimulador involucrado en la regulación de la activación del linfocito T, no existe evidencia de su re-expresión entre las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD8+), CD45RA (antígeno de superficie que fue tradicionalmente utilizado para definir virginidad en las células que lo expresaban, actualmente se considera que su re-expresión en la superficie celular define a los linfocitos T CD8+ terminalmente diferenciados), CD44 (antígeno de superficie que se expresa en todos los linfocitos T de memoria) y moléculas efectoras: perforina y granzima A (todos los linfocitos T CD8+ que han tenido experiencia antigénica expresan a estos factores citotóxicos, incrementando su concentración conforme incrementa su grado de diferenciación) [39]. Este fenómeno ha sido estudiado en patologías como la infección por VIH [40], por citomegalovirus (CMV) [41] o

por el virus Epstein Barr [42]. En estas publicaciones se ha puesto un especial interés en aquellos linfocitos T CD8+ citotóxicos que median la respuesta inmune y expresan receptores asociados a células NK, como CD57 y CD161 [43].

## ANTECEDENTES

CD57 es un marcador de clásico de las células NK, también conocido como HNK-1. CD57 es un polisacárido sulfatado que se expresa en algunas glicoproteínas y glicolípidos y fue descrito inicialmente en linfocitos grandes granulares con gran actividad citotóxica [44]. Estos linfocitos son generalmente localizados en hígado y medula ósea y son más escasos en sangre periférica y ganglios linfáticos. En condiciones de salud una porción de linfocitos T CD8+ puede co-expresar a CD57. La subpoblación de linfocitos T CD8+CD57+ es encontrada en circulación sanguínea de individuos sanos representando entre el 2-5% del total de células mononucleadas [45]. Un incremento en la frecuencia de esta subpoblación ha sido descrito en diferentes patologías tales como artritis reumatoide, infección por citomegalovirus (CMV) y por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [46-48] . En estos estudios se ha intentado definir el fenotipo de los linfocitos T CD8+CD57+ con la finalidad de poder monitorizar de manera mas adecuada la respuesta inmune que realizan *in vivo*. En todos los casos se ha sugerido que esta subpoblación tiene una función efectora citotóxica [47, 49-51]. En el transcurso de los últimos 15 años se han aportado diferentes evidencias con respecto a la posible función de los linfocitos T CD8+CD57+ en diferentes contextos de salud-enfermedad. En el año de 1998, Mollet y colaboradores describieron a través de un ensayo de

citotoxicidad mediada por estimulación con anticuerpos anti-CD3, que al adicionar el sobrenadante del cultivo de linfocitos T CD8+CD57+, a un cocultivo de células LAK con células Daudi (efectoras-blanco) podían reducir el porcentaje de lisis observado previamente cuando el ensayo se realizó sin adicionar dicho sobrenadante. Esta reducción en el porcentaje de lisis no fue observada con el sobrenadante de los linfocitos T CD8+CD57- [52]. A partir de estos experimentos se sugirió que los linfocitos T CD8+CD57+ liberan algún factor que regula la actividad citotóxica. Cuatro años mas tarde, Garland RJ y colaboradores publicaron que los linfocitos T citotóxicos CD8+CD57+ tienen la capacidad de lisar células alogénicas infectadas por virus en un contexto de no restricción por MHC [53]. Los resultados de ese trabajo proponen que existen otras vías, independientes de MHC, a través de las cuales los linfocitos T citotóxicos CD8+ pueden ser activados y mediar sus funciones efectoras. Se sabe que la unión TCR-MHC-péptido es la principal vía a través de la cual los linfocitos T son activados, sin embargo, se ha descrito algunos linfocitos T pueden ser activados a través de estimulación con citocinas [54, 55]. No obstante, en el año 2002, Khan N y colaboradores, informaron que la acumulación de linfocitos T CD8+CD57+ específicos para CMV que se observa en los adultos mayores, puede ser solo un reflejo de inmunosenescencia mas que de la expansión clonal secundaria a la presencia de antígeno [56].

Previamente, en nuestro laboratorio se analizó una subpoblación de linfocitos T CD4+ CD57+ en pacientes con tuberculosis pulmonar. La mayor parte de estos linfocitos mostró un fenotipo caracterizado por ausencia de los marcadores CD28 y CD62L junto con una importante expresión de CD45RO. El perfil de expresión de citocinas también fue analizado después de haber estimulado a



los linfocitos T CD4+CD57+ con antígenos solubles del cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv. Las citocinas IL-4 e IFN- $\gamma$  fueron producidas en mayor proporción por el grupo de pacientes, estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) [57].

Con base en estos antecedentes y tomando en consideración que la función citotóxica de los linfocitos T CD8+ juega un papel fundamental en la protección del hospedero contra Mtb, propusimos analizar la subpoblación de linfocitos T CD8+CD57+, sus características fenotípicas y sus funciones efectoras en una patología en donde su función efectora es considerada fundamental.

## JUSTIFICACION

La principal función de la respuesta inmune celular ante una infección por un patógeno intracelular como *Mycobacterium tuberculosis*, es la eliminación del mismo.

Esta acción es coordinada por diferentes poblaciones de linfocitos T donde los linfocitos T CD8+ pueden conferir tanto protección en el proceso infeccioso como ocasionar daño tisular. Este equilibrio entre protección y daño dependerá, en su mayor parte, de las características fenotípicas y funcionales de la subpoblación de linfocitos T citotóxicos predominante. En este sentido, distintos autores sugieren que los linfocitos T CD8+CD57+ corresponden a células efectoras producto de la expansión clonal secundaria a la persistencia de antígeno [44-46]. Otros autores refieren que son células supresoras que pueden regular la actividad citotóxica [50]. Sin embargo, hay autores que reportan que la mayoría de estas células reconocen al CMV y que se incrementan conforme avanza la edad [54]. Siendo la tuberculosis una enfermedad caracterizada por persistencia de antígeno, es posible que en los pacientes haya un incremento en el número de linfocitos T CD8+ CD57+ de circulación sanguínea y que su actividad corresponda a células efectoras, por lo que posiblemente su citotoxicidad sea mayor que la de los linfocitos T CD8+CD57-. El estudio de esta subpoblación de linfocitos T (CD8+ CD57+) permitirá conocer cual es su potencial citotóxico en la respuesta inmune contra Mtb.

## **HIPOTESIS**

La subpoblación de linfocitos T CD8+ CD57+ se incrementa en los pacientes con tuberculosis pulmonar y su función citotóxica es mayor en proporción que la de los linfocitos T CD8+CD57-.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el porcentaje, las características fenotípicas y funcionales de los linfocitos T CD8+CD57+ en pacientes con tuberculosis pulmonar

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar la frecuencia de linfocitos T CD8+ CD57+ en sangre periférica de pacientes con tuberculosis pulmonar
2. Caracterizar fenotípicamente a los linfocitos T CD8+CD57+ y compararlos con los linfocitos T CD8+ CD57- tanto en pacientes con TB como en individuos sanos.
  - a. Determinar la expresión de los siguientes marcadores de superficie celular: CD45RA, CD44, CD62L, CD69, CD28, CD161.
  - b. Determinar el reconocimiento del glicolípido alfa-galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer) presentada por tetrámeros de CD1d.
3. Para la caracterización funcional, se plantean los siguientes objetivos:
  - a. Medir la actividad citotóxica basal de los linfocitos T CD8+CD57+ versus CD8+CD57- contra monocitos autólogos
  - b. Medir la actividad citotóxica bajo estimulación antigénica (filtrado del cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv) de los linfocitos T CD8+CD57+ versus monocitos autólogos

- c. Evaluar la expresión de las moléculas efectoras perforina y granzima-A.
- d. Evaluar la producción basal de las citocinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$

## **PACIENTES Y METODOS**

### **DISEÑO DEL ESTUDIO**

Prospectivo, transversal, comparativo y observacional.

### **GRUPOS DE ESTUDIO**

- I Pacientes con tuberculosis pulmonar
- II Sujetos sanos PPD+

### **CRITERIOS DE INCLUSION**

- a. Individuos de entre 18 y 60 años de edad de cualquier género que hayan acudido al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias con sospecha de tuberculosis pulmonar.
- b. Baciloscopía positiva en expectoración espontánea por la técnica de Ziehl-Nielsen.
- c. Ausencia de otra co-morbilidad.
- d. Cultivo positivo para *Mycobacterium tuberculosis*.

### **CRITERIOS DE EXCLUSION**

- a. Que el paciente rehúse a participar en el estudio.
- b. Pacientes admitidos en la unidad de cuidados intensivos y/o intermedios
- c. Tuberculosis extrapulmonar

### **CRITERIOS DE ELIMINACION**

- a. Individuos con cultivo negativo para *Mycobacterium tuberculosis* a los 70 días.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Las variables normalmente distribuidas, evaluadas a través de la prueba de sesgo y kurtosis, se presentan en media y desviación estándar. Para distribuciones no normales se utilizó la mediana y el rango intercuartilar. La comparación entre grupos se realizó por medio de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (U de Mann-Whitney) para variables no normales y por medio de la prueba t de student para variables con distribución normal. Para el análisis de los datos se utilizó el programa STATA™ 8.0 y se consideró como valor estadístico significativo a una  $p < 0.05$ .

### **CONSIDERACIONES ETICAS**

El protocolo fue aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

### **Consentimiento informado**

Cada paciente firmó una carta de consentimiento informado después de haber recibido una explicación amplia de los objetivos y beneficios esperados del protocolo, así como de sus posibles complicaciones.

### **Reacciones adversas**

La única intervención realizada en los sujetos fue una venopunción, la cual se realizó por personal experto y con material estéril. La venopunción solo genera dolor leve y en algunos casos excepcionales pequeños hematomas.

Una vez reunidos los criterios de inclusión y exclusión y haber firmado la carta de consentimiento informado, se realizó la venopunción en las extremidades superiores tras un ayuno de 8 hr y se obtuvieron 20ml de sangre para todos los ensayos experimentales excepto los ensayos de citotoxicidad en donde se requirieron 40 ml.

### ***PACIENTES***

En este protocolo participaron individuos con diagnóstico de tuberculosis pulmonar, provenientes de la Consulta Externa y de la Unidad de Atención e Investigación en Tuberculosis del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. El diagnóstico de tuberculosis pulmonar se estableció por la confirmación del crecimiento de Mtb en cultivo de esputo. Todos los pacientes incluidos fueron clasificados como clase 3 y categoría I según la Sociedad Americana del Tórax, es decir, todos los pacientes eran casos nuevos de TB activa [58]. Los individuos que participaron como parte del grupo control fueron

voluntarios, adultos saludables y firmaron una carta de consentimiento informado.

## *REACTIVOS*

Anticuerpos monoclonales conjugados al isotiocianato de fluoresceína (FITC) dirigidos contra CD45RA, CD62L, CD57, CD69, CD161, perforina, interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), factor alfa de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ); anticuerpos monoclonales conjugados a ficoeritrina (PE) dirigidos contra CD8, CD14, CD28, CD44, y granzima A y anti-IgM de ratón conjugado a PerCp-Cy5.5 fueron obtenidos de PharMingen BD (San Diego, CA, USA). El anticuerpo monoclonal del isotipo IgM antiCD57 humano fue obtenido de Zymed Lab. (San Francisco, CA, USA). El anticuerpo monoclonal del isotipo IgG2 antiHLA-ABC fue obtenido de Dako (Glostrup, Denmark). El kit de separación magnética (MACS) para linfocitos T CD8+ fue obtenido de Miltenyi-Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). Los tetrámeros de CD1d acoplados al glicolípido  $\alpha$ -galactosilceramida fueron donados por el Dr. Mitchell Kronenberg del Instituto de Inmunología y Alergia de La Jolla, San Diego, CA, USA. El Lymphoprep (Ficoll con densidad 1.077) fue obtenido de Nycomed Pharma As (Nyegaard, Oslo, Norway). La concanavalina-A (Con-A), 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA), ionomicina, el medio de cultivo RPMI-1640, penicilina, saponina, brefeldina A, paraformaldehído, suero fetal bovino, azul de tripano y las sales utilizadas para la preparación de los amortiguadores fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). El piruvato de sodio, L-glutamina y 2-mercaptoetanol fueron de Gibco BRL (Rockville, MD, USA). El kit para la determinación de la actividad citotóxica fue obtenido de Roche Molecular



Biochemicals (Mannheim, Germany). Carboxifluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) fue obtenido de Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA). El antígeno utilizado proviene del filtrado del cultivo de *M. tuberculosis* cepa H37RV (ATCC 27294) donado por la Dra. Diana Aguilar León, Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Subirán”, México, D.F.

**Obtención de células mononucleadas.** Las células mononucleadas fueron separadas del paquete eritrocitario por centrifugación a 1,750 r.p.m. en un gradiente de Ficoll-Hypaque (1.077 de densidad) durante 30 minutos a 4°C [59]. Después de la centrifugación, se colectaron las células de la interfase y se lavaron 2 veces en solución PBS antes de ser cuantificadas en un hemocitómetro. La viabilidad celular se valoró por el método de exclusión del colorante azul Tripano. La suspensión celular se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^7$  células por ml.

**Monocitos, linfocitos T CD8+ y linfocitos T CD8+CD57+.** Las células mononucleadas fueron resuspendidas en medio de cultivo complementado (RPMI 1640, HEPES 10mM, L-glutamina 200 mM) y cultivadas en placas de plástico (Nalgene Nunc Internacional, Denmark) durante 1.5 horas para permitir la firme adhesión de los monocitos. Posteriormente las células no adherentes fueron removidas y nuevamente suspendidas en medio de cultivo complementado para la recuperación de los linfocitos T CD8+. Las células adherentes se recuperaron de las placas de cultivo al adicionarles PBS/EDTA 0.05 mM [60]. Para obtener los linfocitos T CD8+ se utilizó un sistema de

inmunomagneto selección negativa. Las células mononucleadas fueron incubadas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD4+, CD11b+, CD16+, CD19+, CD36+ y CD56+ unidos a un hapteno. En un segundo tiempo se utilizó un anticuerpo monoclonal dirigido contra el hapteno, este anticuerpo está conjugado a perlas magnéticas. Posteriormente, la suspensión celular se hizo pasar a través de una columna de separación colocada en un campo magnético en donde las células reconocidas por los anticuerpos fueron retenidas, dejando pasar a la población no retenida que correspondió a los linfocitos T CD8+. Finalmente, la población de linfocitos T CD8 fue resuspendida en medio RPMI-1640 sin suero fetal a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml y su pureza se determinó mediante inmunofluorescencia con el uso de anticuerpos monoclonales contra CD8 siendo siempre superior al 95%. Las células CD57+ fueron aislados a partir de los linfocitos T CD8+ utilizando un anticuerpo monoclonal murino dirigido contra CD57 (isotipo IgM) y un anticuerpo secundario anti IgM acoplado a esferas magnéticas. Nuevamente la suspensión celular fue aplicada a una columna de separación colocada en un campo magnético. En esta ocasión las células no retenidas correspondieron a los linfocitos T CD8+CD57-, mientras que la fracción retenida correspondió a los linfocitos T CD8+CD57+. Ambas subpoblaciones fueron cuantificadas y se determinó la viabilidad celular siendo superior al 95%. La pureza de ambas subpoblaciones se determinó por citometría de flujo, siendo mayor al 94%.

**Fenotipo celular.** Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia directa para determinar los marcadores de superficie celular CD57 contra CD8 en células mononucleadas de sangre periférica. Se realizó doble inmunofluorescencia

directa sobre linfocitos T CD8+ para analizar la expresión basal de los siguientes marcadores CD44, CD45RA, CD62L, CD28, CD69, CD161 y tetrámeros de CD1d- $\alpha$ GalCer contra CD57. Para este ensayo se incubaron  $2 \times 10^5$  linfocitos T CD8+ en 20  $\mu$ l de amortiguador PBS-A (0.2% de albúmina de suero bovino y 0.2% de azida de sodio en PBS) con los distintos anticuerpos monoclonales. Las incubaciones fueron de 30 minutos a 4°C en oscuridad y después de cada incubación, las células se lavaron dos veces con PBS-A y finalmente se analizaron en un citómetro de flujo (Becton and Dickinson, CA, USA).

**Citotoxicidad celular.** La actividad citotóxica se evaluó en linfocitos T CD8+CD57+ y en los CD57- en cocultivo con monocitos autólogos mediante un ensayo cuantitativo y colorimétrico que estima la muerte celular. Este ensayo se realizó siguiendo las instrucciones de un kit para determinar la citotoxicidad celular (Roche Molecular Biochemicals), se basa en la medición de la actividad de la enzima deshidrogenasa láctica (DHL) que se libera desde el citosol de las células dañadas hacia el sobrenadante donde se encuentran en cultivo. Este sobrenadante se colecta libre de células y se incuba con una mezcla de reacción que es parte del kit. La actividad de la DHL se determina en un ensayo enzimático: en el primer paso la DHL reduce al NAD<sup>+</sup> a NADH+H por una reacción de oxidación del lactato a piruvato, y en la segunda reacción enzimática 2 H<sup>+</sup> son transferidos desde el NADH+H a la sal tetrazolium (amarillo pálido), la cual se reduce a formazan (rojo). Un incremento en la cantidad de células muertas resulta en un incremento de la actividad de la DHL en el sobrenadante del cultivo. Este incremento correlaciona directamente con

la cantidad de la sal de formazán formada. La absorbancia de la muestra se lee a 490 o 492 nm en un lector de ELISA. De manera preliminar se determinó la concentración óptima de células blanco (monocitos autólogos) que se utilizó en el ensayo final según las especificaciones del kit. Este procedimiento consistió en determinar la actividad de la enzima DHL del medio de cultivo (DHL basal), la actividad de la DHL liberada espontáneamente por las células blanco que en este caso corresponde a los monocitos autólogos (liberación basal) y la actividad máxima de la DHL liberada por las células blanco cuando estas son incubadas con Triton-X-100 (liberación máxima). Se utilizó la concentración celular a la cual la diferencia entre los valores mínimo y máximo fue la mayor ( $1 \times 10^5$  células) (Fig. A). En virtud de la dificultad para obtener un gran número de linfocitos T CD8+CD57+ que permitiera realizar el ensayo a diferentes relaciones (efectora:blanco) decidimos utilizar la relación de 1:1 con una duración de 4 hrs. Una limitante de este ensayo es que no permite saber de qué célula proviene la DHL, por este motivo complementamos nuestros ensayos de citotoxicidad con una versión modificada del ensayo (versatile fluorometric technique for assessing CTL) descrito por Hermans IF. en el año 2004 [61].

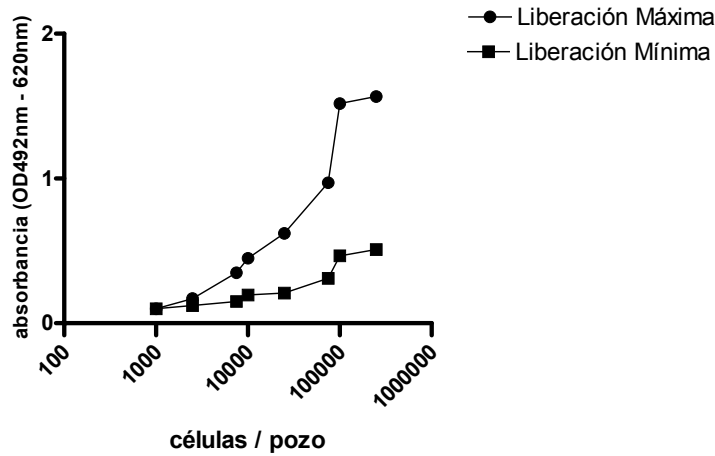


Figura A. Determinación de la concentración óptima de células blanco. La actividad de la enzima deshidrogenasa láctica fue determinada después de 4 horas de cultivo de monocitos en reposo (liberación mínima) o tratados con el detergente Tritón X-100 (liberación máxima).

### Diseño del ensayo

	DHL basal del medio de cultivo	Liberación basal de DHL por los monocitos	Liberación máxima de DHL por los monocitos	Medio de cultivo	Efectoras: Blanco
<b>RPMI 1640</b>	200µl	100 µl	-----	100 µl	-----
<b>Monocitos autólogos</b>	-----	100 µl	100 µl	-----	100 µl
<b>Linfocitos CD8+CD57+ o CD57-</b>	-----	-----	-----	100 µl	100 µl
<b>Triton X-100</b>	-----	-----	100 µl	-----	-----
<b>Vol. Final</b>	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

\*Todos los experimentos se realizaron por triplicado

**Citotoxicidad celular de linfocitos T CD8+CD57+ y CD57- estimulados con sobrenadante del cultivo de la cepa H37Rv (FC-H37Rv) sobre monocitos autólogos.** De manera preliminar se realizó una cinética de concentración para el uso del FC-H37Rv que permitió establecer los lineamientos óptimos para el ensayo (Fig. B). El tamaño de muestra fue de 4 para estos experimentos y todos los ensayos se realizaron por triplicado en linfocitos T CD8+CD57+ de pacientes con tuberculosis. La concentración de antígeno micobacteriano que se decidió utilizar fue de 4.0  $\mu\text{g/ml}$  debido a que ese rango de concentración ofreció una ventana adecuada para observar la variación de las muestras. Una vez determinada la concentración adecuada de antígeno, el ensayo se realizó de la misma manera que la citotoxicidad basal, excepto que al momento de colocar los linfocitos T CD8+CD57+/monocitos autólogos en co-cultivo (pozo de células efectoras:blanco) se adicionaron 4.0  $\mu\text{g/ml}$  del FC-H37Rv durante 4 hrs.

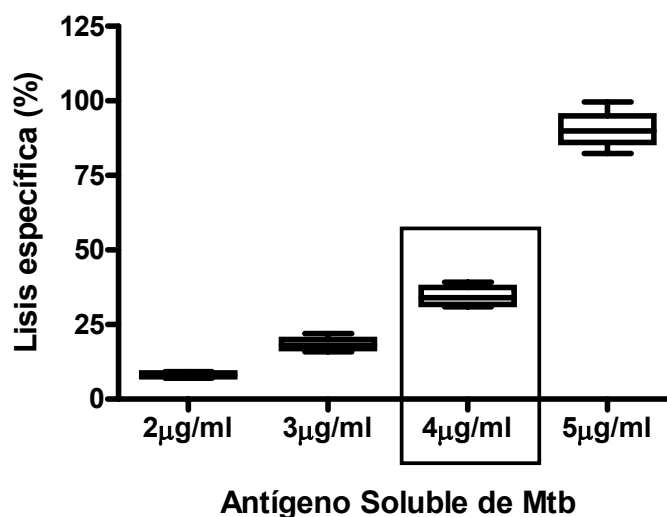


Figura B. Curva de concentración de antígeno soluble de Mtb. Ensayo de citotoxicidad de linfocitos T CD8+ cocultivados con monocitos autólogos en presencia de antígeno a diferentes concentraciones.

**Evaluación de la actividad citotóxica en linfocitos T CD8+CD57+ y CD57- mediante el uso de CFSE (carboxifluorescein diacetate succinimidyl ester).**

Con la finalidad de determinar si los linfocitos T CD8+ CD57+ o CD57- estaban actuando como células efectoras sobre los monocitos autólogos, diseñamos un método alternativo para evaluar la actividad citotóxica. Este es un método cualitativo que permite conocer de una manera rápida si los linfocitos T CD8+ están mediando citólisis, que no emite radiactividad y que se basa en el ensayo VITAL (versatile fluorometric technique for assessing CTL) descrito por Hermans IF. en el año 2004 [61]. Una vez recuperados los monocitos de las placas de adherencia, se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^7$  y se incubaron con CFSE (0.25  $\mu$ M) en oscuridad, durante 15 minutos y a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 8.0 ml de RPMI-1640 complementado (10% SFB), se centrifugaron a 1,750 rpm. durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en RPMI-1640 suplementado con suero fetal al 1%. Los linfocitos T CD8+CD57+ o CD57- se cultivaron con los monocitos autólogos en una placa de 96 pozos manteniendo una relación efectoras:blanco de 1:1 (como en los ensayos de la DHL). Se estimularon con 4.0  $\mu$ g/ml del FC-H37Rv durante 4 horas. Posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos y se recuperaron 100 $\mu$ l de sobrenadante de cada pozo para evaluar la emisión de fluorescencia a partir de los monocitos dañados. La fluorescencia se midió en un Fluorómetro VersaFluor System a 490 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La fluorescencia basal se obtuvo mediante los monocitos autólogos tratados con CFSE, en reposo, mientras que la máxima de fluorescencia se obtuvo al incubar los monocitos

autólogos con Triton-X-100 al 1%. Los resultados son expresados como el promedio de las densidades ópticas cuando las muestras se leyeron a 490 nm (Unidades Relativas de Fluorescencia, URF). Estos experimentos se realizaron solamente en pacientes y en paralelo con los de LDH estimulados con FC-H37Rv.

#### **Evaluación de la actividad citotóxica en linfocitos T CD8+CD57+ y CD57- bloqueando la molécula presentadora de antígeno clase I (HLA-ABC).**

El ensayo siguió las mismas características metodológicas que los anteriores, con la excepción de que las células blanco (monocitos autólogos) fueron pre-incubados durante 30 minutos con un anticuerpo monoclonal anti-HLA-ABC y después se realizó el cocultivo con los linfocitos T CD8+CD57+ o CD57- (pozo de células efectoras:blanco) estimulados con 4.0 µg/ml del FC-H37Rv durante 4 horas.

#### **Detección de DNA micobacteriano por PCR *in situ***

Las células mononucleadas provenientes de 3 pacientes y 2 individuos sanos fueron resuspendidas en medio de cultivo complementado (RPMI 1640, HEPES 10mM, L-glutamina 200 mM) y cultivadas en placas de plástico (Nalgene Nunc Internacional, Denmark) durante 1.5 horas para permitir la firme adhesión de los monocitos. Posteriormente, tanto las células adherentes como las no adherentes fueron recuperadas y su concentración se ajusto a  $1 \times 10^6$



células/ml para la detección de DNA micobacteriano (secuencia IS6110) por la técnica de PCR *in situ*. La secuencia de inserción que se utilizó fue IS6110 (*Mycobacterium tuberculosis*). Las células adherentes y no adherentes fueron dispuestas en laminillas mediante la técnica de citospin. Posteriormente fueron colocadas en un termociclador para la reacción de amplificación. Los productos del PCR fueron detectados por medio de anticuerpos de borrego anti-digoxigenina conjugados a la enzima fosfatasa alcalina. Esta sección del trabajo fue realizada en colaboración con la Dra. Diana Aguilar-León en la sección de Patología Experimental, Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Subirán”.

**Expresión de Perforina, Granzima A y citocinas intracelulares.** Una vez aisladas las poblaciones enriquecidas de linfocitos T CD8+CD57+ y CD8+CD57- se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 complementado y se realizó la determinación de citocinas intracelulares [62]. Para la determinación del TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  se utilizó el siguiente protocolo: una vez obtenidos los linfocitos T CD8+CD57+ y los CD8+CD57- fueron incubados durante cuatro horas, tiempo durante el cual se agregó brefeldina-A (10 $\mu$ g/ml), PMA (50 ng/ml) y ionomycin (500 nM) por cada 1 X 10<sup>6</sup> células (CD8+CD57+ y CD8+CD57-), al final de la incubación las células fueron recuperadas y lavadas 2 veces con PBS-A. Para la determinación de perforina y granzima A no se utilizó estímulo alguno. Posteriormente se incubaron 10 minutos mas con una solución amortiguadora para permeabilizar (0.1% saponina, 0.01% IgG de cerdo, 10 mM HEPES, 10% BSA en PBS) en agitación continua durante 10 min. Inmediatamente, las células fueron incubadas con anticuerpos

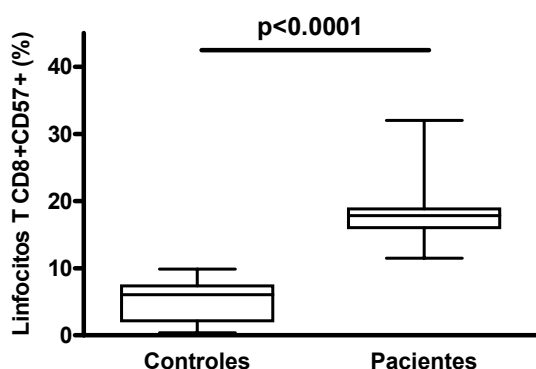
monoclonales anti perforina-FITC, anti granzima A-PE, anti-IFN- $\gamma$ -FITC y anti TNF- $\alpha$ -FITC o con anticuerpos anti-isotipo conjugados a los mismos fluorocromos. Después de 30 minutos de incubación, las células se lavaron con saponina al 0.1% y se analizaron mediante citometría de flujo.

## RESULTADOS

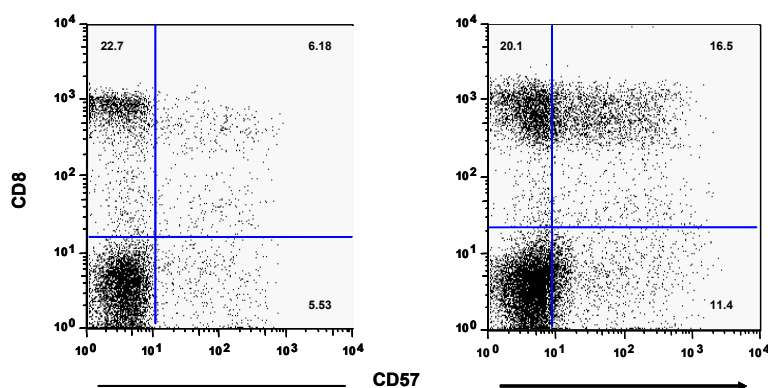
### Frecuencia y Características Fenotípicas de los Linfocitos T CD8+ CD57+ en pacientes con Tuberculosis Pulmonar e Individuos sanos.

Se incluyeron 20 pacientes con tuberculosis pulmonar que fueron considerados como casos nuevos y por lo tanto nunca habían recibido tratamiento antituberculoso. La edad promedio de este grupo fue  $36.0 \pm 7.4$  años. El grupo testigo estuvo conformado por 20 pacientes sanos que tuvieron una edad promedio de  $44.9 \pm 12.6$ . Los valores basales de la proporción de linfocitos T CD8+CD57+ en los pacientes con tuberculosis pulmonar y el grupo testigo se muestran en la **Figura 1**.

**A.**



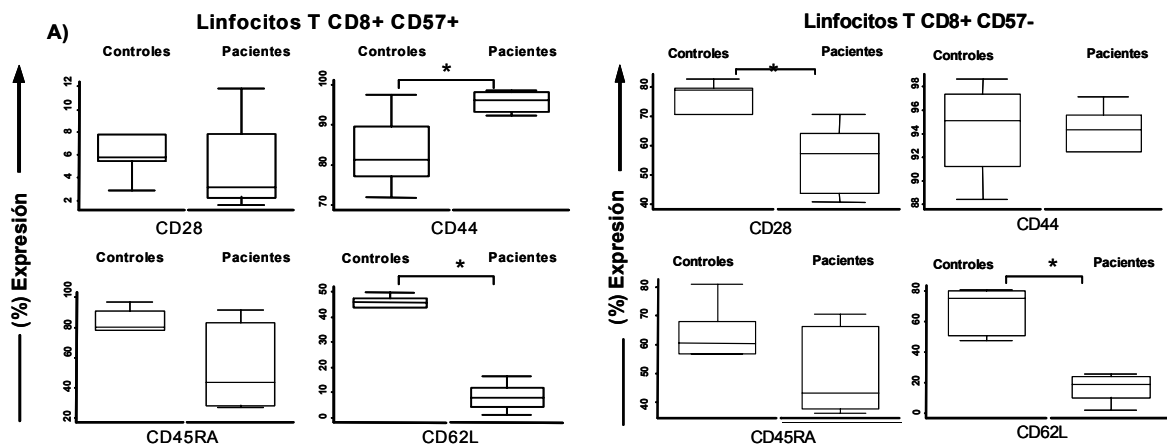
**B.**

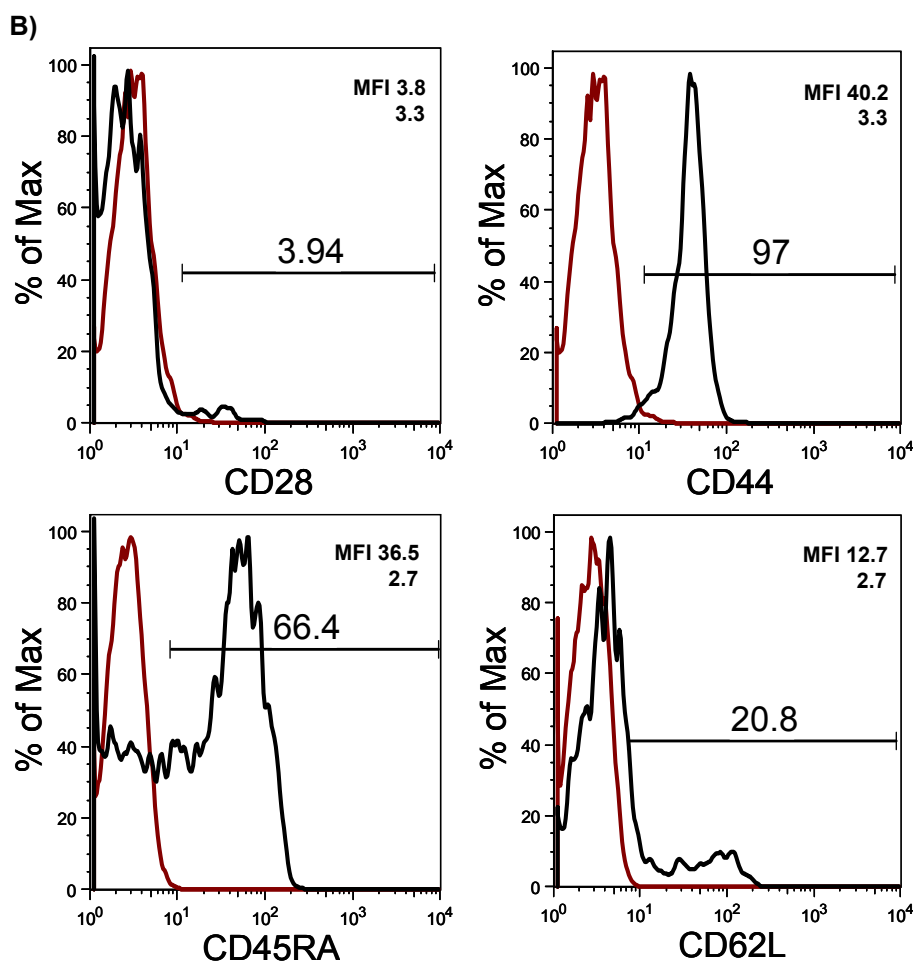


**Figura 1.** Frecuencia de linfocitos T CD8+CD57+. A. La frecuencia de linfocitos T CD8+CD57+ se obtuvo a partir de doble inmunofluorescencia directa en células mononucleadas de sangre periférica. Los datos son expresados como medianas y rango intercuartil.  $n = 20$ . B. Las gráficas son representativas del porcentaje de linfocitos T CD8+CD57+ de un individuo sano y de un paciente.

En la Figura 1A se puede observar que los pacientes con tuberculosis pulmonar tienen una mayor proporción de linfocitos T CD8+ que coexpresa al marcador CD57 que los individuos control. La mediana fue de 17.9% para los pacientes, [riq 16.4-19.0], y de 6.1% para el grupo control [riq 2.2-7.1]. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.0001$ ).

Una vez conocida la frecuencia de la subpoblación decidimos analizar la expresión diferencial de los siguientes marcadores: CD28, CD44, CD62L, CD45RA, CD161 y CD69. Considerando que la mejor herramienta que existe hasta el momento para identificar linfocitos NKT es el uso de tetrámeros de CD1d unidos a alfa-galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer), analizamos el reconocimiento hacia este glicolípido. Los resultados sobre el porcentaje de expresión de los marcadores fenotípicos se muestran en la Figura 2A. Basados en el perfil de expresión encontrado y en la evidencia que existe en la literatura acerca de fenotipo de los linfocitos T CD8+ citotóxicos consideramos que esta subpoblación cumple con las características necesarias para denominar efectores a los linfocitos T CD8+CD57+.



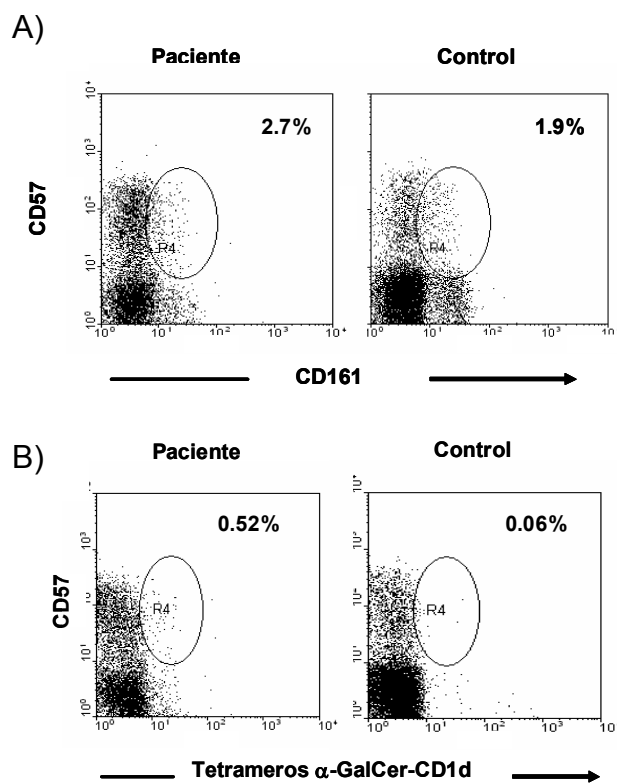


**Figura 2.** Expresión de marcadores fenotípicos en linfocitos T CD8+CD57+ y CD8+CD57- de pacientes con tuberculosis pulmonar e individuos sanos. Los linfocitos T CD8+CD57+ y CD8+CD57- purificados fueron analizados para la expresión de CD28, CD44, CD45RA y CD62L. **A.** Los datos son expresados como medianas y rango-intercuartil. \*  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ . **B.** Intensidad Media de Fluorescencia de los mismos marcadores. Los histogramas son representativos de un paciente.

Los resultados mostraron que la gran mayoría de los linfocitos T CD8+CD57+ tenían una expresión disminuida de CD28 en su superficie, tanto en el grupo de pacientes, [md 3.1%, riq 2.3 – 7.9] como en el de individuos sanos [md 5.0%, riq 5.5 – 7.8]. Sin embargo, al analizar a los linfocitos T CD8+CD57- la expresión de CD28 fue distinta y pudimos observar una mayor expresión de este marcador en ambos grupos, principalmente en los individuos sanos [md 79.0%, riq 70.6 – 79.6] cuando se comparan con los pacientes [md

57.1%, riq 43.9 - 64.2] ( $p < 0.03$ ). Con respecto a los otros marcadores de superficie celular, los linfocitos T CD8+CD57+ mostraron expresión de CD44 incrementada en el grupo de pacientes [md 96.2%, riq 93.2 – 98] que fue 0.8 veces mayor con respecto a la de los individuos sanos [md 81.3%, riq 77.3 – 89.6] ( $p < 0.03$ ), pero que a su vez, no fue distinta de la observada en los linfocitos T CD8+CD57- de ambos grupos. La expresión de CD62L en los linfocitos T CD8+CD57+ fue menor en el grupo de pacientes [md 7.7%, riq 4.3 – 11.8] con respecto al grupo de individuos sanos [md 45.7%, riq 44.1 – 47.6]; esta tendencia se conservó cuando el análisis se realizó en la subpoblación de linfocitos T CD8+CD57- en donde la mediana para el grupo de pacientes fue de 18.6% [riq 10.3 – 23.9] mientras que la mediana para el grupo testigo fue de 75.5% [riq 50.6 – 80.1]. En ambos casos hubo diferencia estadística ( $p < 0.009$  y  $p < 0.006$  respectivamente). Con respecto a CD45RA no encontramos diferencias entre las subpoblaciones de linfocitos T CD8+CD57+ y CD8+CD57- así como entre los grupos estudiados (pacientes e individuos sanos), lo cual pudiera ser explicado por la re-expresión de la molécula como ha sido informado en estudios previos (43). La Figura 2B muestra histogramas representativos de un paciente con tuberculosis y la intensidad media de fluorescencia para cada uno de los mismos marcadores analizados en el panel superior. Con respecto a la expresión de CD161 y el reconocimiento del glicolípido  $\alpha$ GalCer como marcadores específicos de linfocitos NKT, los resultados mostraron que el 2.7% de los linfocitos T CD8+CD57+ de los pacientes y el 1.9% de los linfocitos T CD8+CD57+ de los individuos sanos expresan CD161 (Figura 3A), mientras que el 9.7% de los linfocitos T CD8+CD57- de los pacientes y el 15.3% de los linfocitos T CD8+CD57- de de

los individuos sanos expresan CD161. El porcentaje de reconocimiento de la  $\alpha$ GalCer al ser presentada por tetrámeros de CD1d fue de 0.52% para los linfocitos T CD8+CD57+ de los pacientes y 0.06% para los individuos sanos (Figura 3B). Es importante considerar que la cantidad de reactivo que nos fue obsequiada (tetrámeros de CD1d) solo permitió analizar 3 individuos por grupo y que incrementar el tamaño de la muestra podría haber ofrecido la posibilidad de encontrar diferencias estadísticas entre los grupos.



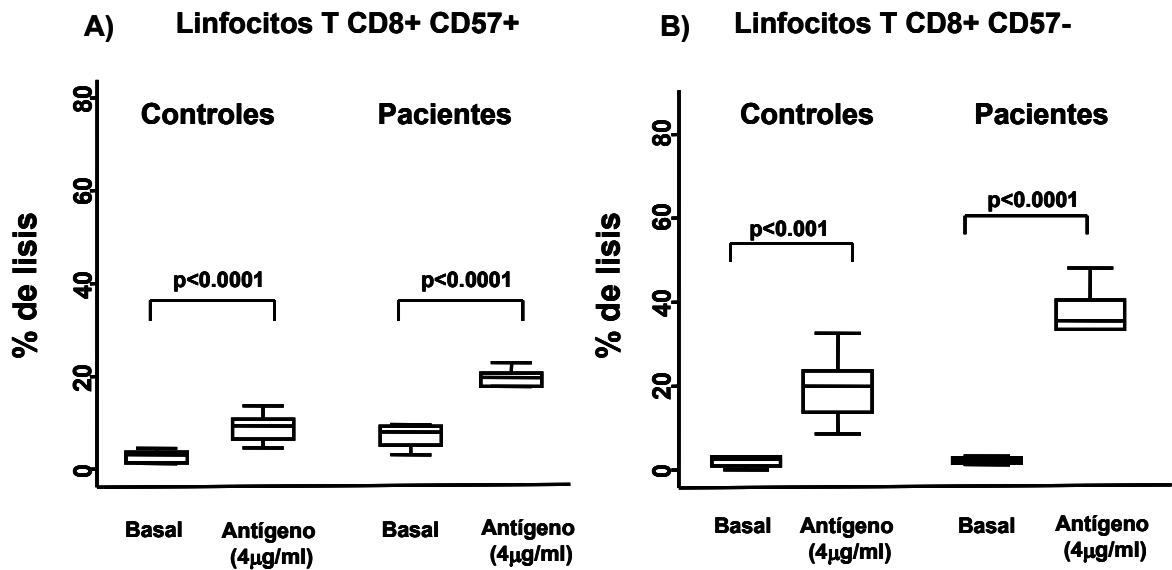
**Figura 3.** Expresión de CD161 (panel superior) y reconocimiento de  $\alpha$ -GalCer por linfocitos T CD8+CD57+ (panel inferior). Las imágenes que se muestran son representativas de un paciente con tuberculosis pulmonar y un individuo sano A. Expresión de CD161 y B. Reconocimiento de  $\alpha$ -GalCer

## **Actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+CD57+ y CD57- mediante la determinación de la actividad de la deshidrogenasa láctica**

Posterior a la caracterización fenotípica, analizamos la habilidad *ex-vivo* de los linfocitos T CD8+CD57+ y CD8+CD57- para lisar monocitos autólogos. Se utilizó un ensayo cuantitativo que mide la actividad de la enzima deshidrogenasa láctica cuando ésta es liberada desde el citoplasma de las células dañadas hacia el medio de cultivo. El ensayo se realizó manteniendo una relación de una célula efectora por una célula blanco (1:1), y estuvo integrado por diferentes condiciones experimentales; la primera fue ausencia de estímulo antigénico, la segunda fue estimulando con antígenos solubles provenientes del FC-H37Rv como una forma indirecta de evaluar la capacidad de presentación de antígenos exógenos presente en los monocitos autólogos de sangre periférica, y la tercera condición experimental fue bloqueando la presentación antigénica por MHC-I con anticuerpos monoclonales. En la Figura 4A se muestra como los linfocitos T CD8+CD57+ de los pacientes con tuberculosis pulmonar expresan una mayor actividad citotóxica *ex-vivo* sobre los monocitos autólogos (md 8.05%, riq 5.1 – 9.2 (comparado con la misma subpoblación en los individuos sanos (md 3.0%, riq 1.3 – 3.6( (p<0.03). Esta diferencia se mantuvo cuando se comparo con los linfocitos T CD8+CD57- en ambos grupos, Figura 4B. Una vez que el ensayo se realizó en condiciones de estimulación antigénica la subpoblación de linfocitos T CD8+CD57+ incremento su actividad citotóxica tanto en el grupo de pacientes como en el de controles, Figura 4A. La mediana en los pacientes fue de 19.8%, (riq 17.8 – 20.7 (mientras que en los individuos sanos fue de 9.3%, (riq 6.4 – 10.7( (p<0.01). Este incremento en los pacientes fue 2.1 veces mayor que el observado en los



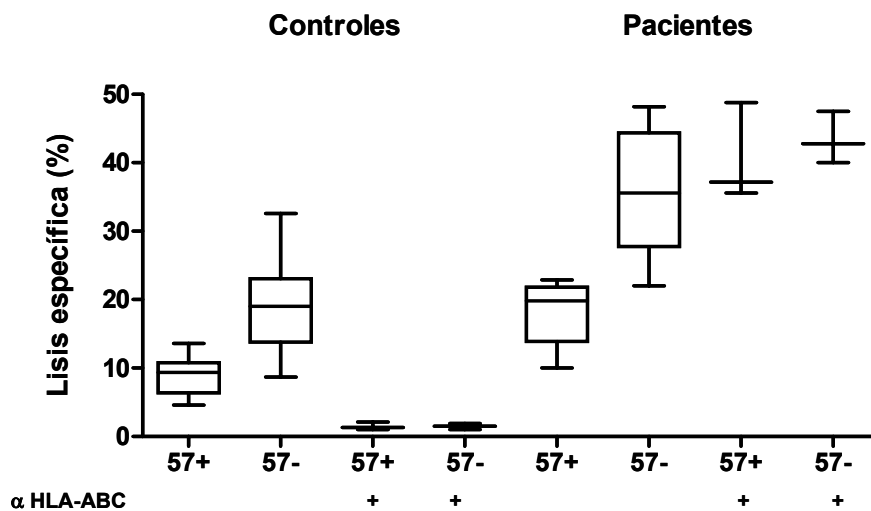
individuos sanos. De manera semejante, los linfocitos T CD8+CD57- también incrementaron su actividad citotóxica; la mediana para los pacientes fue de 35.6%, (riq 33.5 – 40.5 (mientras que para los individuos sanos fue de 20.0%, (riq 13.8 – 23.6 ( $p < 0.02$ ).



**Figura 4.** Actividad citotóxica ex vivo de los linfocitos T CD8+CD57+ y CD8+CD57-. A. La citotoxicidad se evaluó mediante un ensayo colorimétrico de 4 hr de duración que determina la actividad de la enzima DHL en condiciones de ausencia de estimulación antigénica y estimulando con antígenos solubles de la cepa H37Rv (4.0 µg/ml). El panel A muestra los datos de los linfocitos T CD8+CD57+ y el panel B) muestra los correspondientes a los linfocitos T CD8+CD57-. n=6 \* $p < 0.05$ .

Para determinar si el incremento en la actividad citotóxica que se observó después de la adición de antígenos solubles estaba o no mediado por moléculas clase I, decidimos pre-incubar los monocitos autólogos con anticuerpos monoclonales anti-HLA-ABC durante 30 min. En el grupo control se demostró un bloqueo superior al 99% en la actividad citotóxica en ambas subpoblaciones linfocitarias (CD8+CD57+ 0.3% y CD8+CD57- 0.01%, n=3),

mientras que en el grupo de pacientes la actividad citotóxica no fue inhibida con el anticuerpo de bloqueo (CD8+CD57+ 40.2±6.1%, CD8+CD57- 45.1±3.3%) (Figura 5).

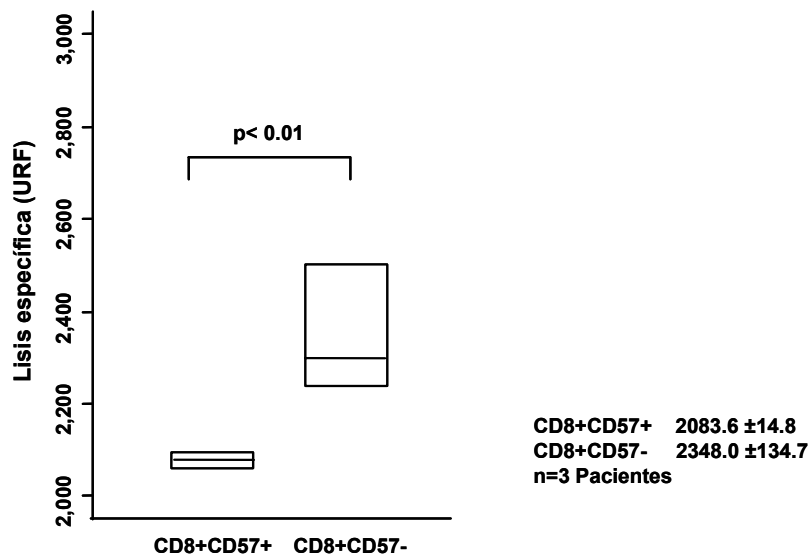


**Figura 5.** Bloqueo de la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+CD57+ y CD8+CD57-. Los monocitos autólogos fueron pre-incubados con un anticuerpo monoclonal anti-HLA-ABC durante 30 minutos antes del ensayo como se describe en métodos. n = 3.

### Actividad citotóxica de los Linfocitos T CD8+CD57+ y CD57- mediante el uso de CFSE.

Una de las interrogantes que surgieron con los ensayos de citotoxicidad que evalúan la actividad de la DHL, fue saber si el linfocito T CD8+CD57+ ó CD57- tenía comportamiento de célula efectora. Para resolver esta situación diseñamos un método alternativo que evalúa la actividad citotóxica al mismo tiempo que puede indicarnos si el linfocito T CD8+ esta mediando citólisis de la célula blanco. Este ensayo se realizó en paralelo con los ensayos de la DHL en el grupo de pacientes y se estimuló con FC-H37Rv (misma concentración y

tiempo). Los resultados se muestran en la Figura 6, y podemos observar que la emisión de fluorescencia que encontramos en las dos subpoblaciones de linfocitos nos indica que hubo daño a la membrana del monocito. Por otra parte encontramos la misma tendencia de comportamiento de los linfocitos T CD8+CD57+ y CD57- que la observada en los ensayos que evalúan la actividad de la DHL.

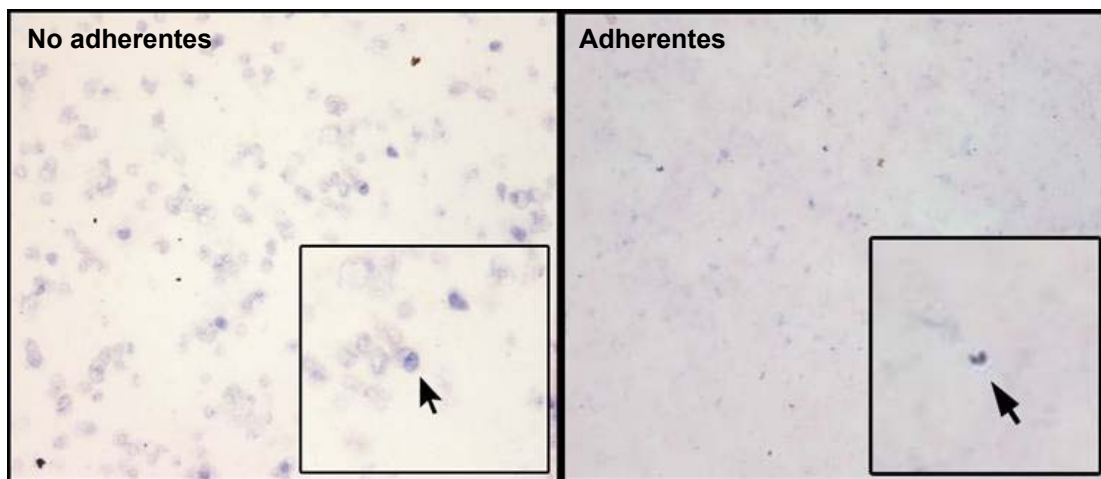


**Figura 6.** Fluorescencia emitida a partir de los monocitos tratados con CFSE. Los linfocitos T CD8+CD57+ y CD8+CD57- de paciente con TB fueron incubados durante 4 hrs. con los monocitos autólogos tratados con CFSE y estimulados con FC-H37Rv. Durante los ensayos se mantuvo una relación 1:1 (efectora:blanco). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. n=3.

### **Presencia de DNA micobacteriano revelado por PCR *in situ* en células mononucleadas de sangre periférica de pacientes con tuberculosis pulmonar.**

Nosotros seleccionamos la secuencia de inserción IS6110 para la determinación del DNA micobacteriano porque ha mostrado tener una especificidad del 90-95% en muestras clínicas [63]. Los resultados de la Figura

7 mostrarn que las células adherentes y no adherentes de los 3 pacientes fueron positivas al DNA micobacteriano. No se encontraron resultados positivos en el grupo de individuos sanos. No se realizo enumeración de las células positivas o algún análisis estadístico de esta sección.

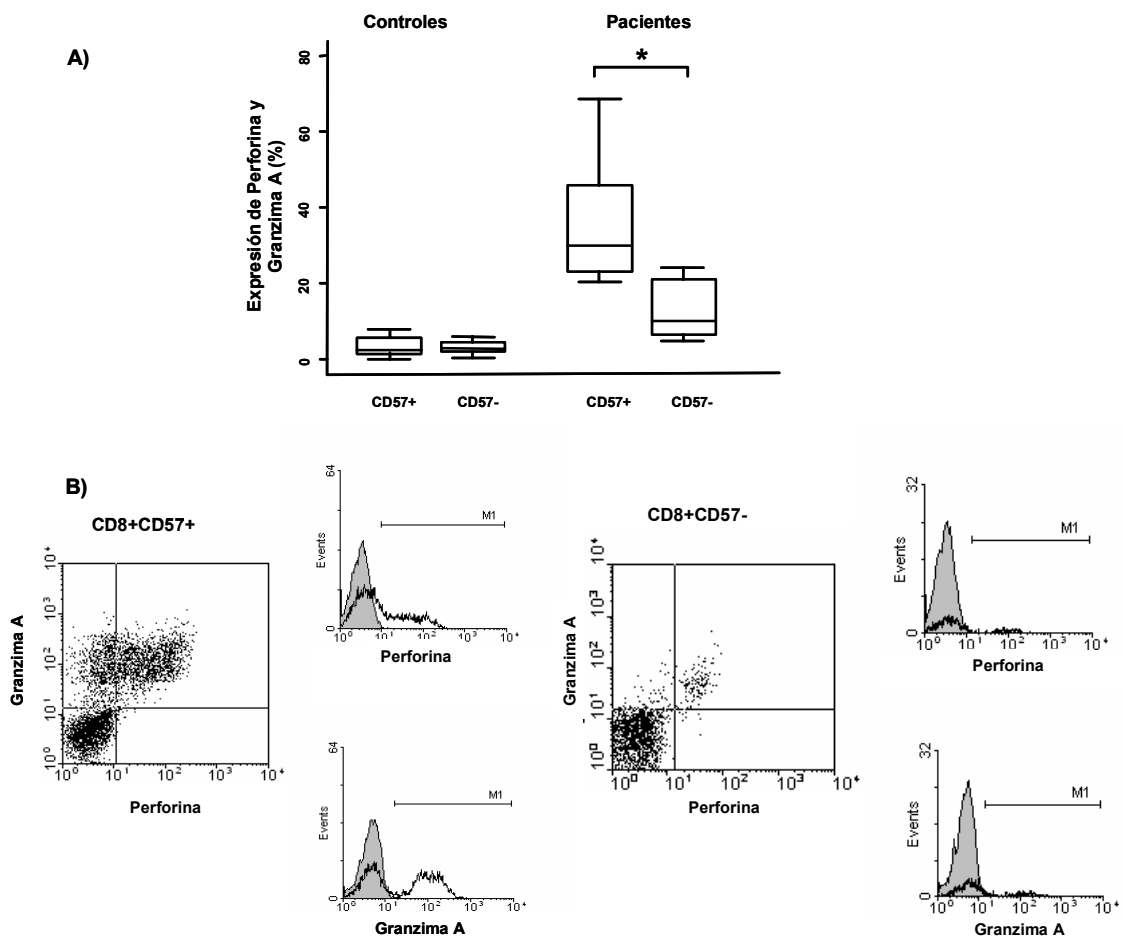


**Figura 6.** Fotografías representativas de la localización celular del DNA micobacteriano revelado por PCR in situ en células no adherentes (panel izquierdo) y adherentes (panel derecho) de un paciente con tuberculosis pulmonar. Las flechas indican la positividad al DNA micobacteriano.

### **Expresión de Perforina y Granzima A**

El porcentaje y concentración de perforina y granzima-A en linfocitos T CD8+CD57+ y CD8+CD57- se analizó en ausencia de estimulación antigénica. En la Figura 8A podemos observar que ambas subpoblaciones de linfocitos T CD8+ de los individuos sanos tuvieron porcentajes bajos de perforina y granzima-A (CD57+ md 2.7%, riq 1.8 – 5.6 y CD57- md 2.9% riq 2.3 – 4.5 respectivamente) a diferencia de los resultados obtenidos de los pacientes (CD57+ md 29.9%, riq 23.3 – 46.0 versus CD57- md10.3% riq 6.8 – 21.3)( $p<0.01$ ). El análisis de la intensidad media de fluorescencia (MFI) en los

linfocitos T CD8+CD57+ de los pacientes no mostró diferencias en la densidad de expresión para la perforina comparado con los linfocitos T CD8+CD57- (md 7.1% versus md 5.1%), sin embargo; los linfocitos T CD8+CD57+ presentaron una mayor densidad expresión de granzima-A (md 27.9%) comparado con los linfocitos T CD8+CD57- (md 9.6%) ( $p < 0.0001$ ) (Figura 8).



**Figura 8.** Expresión *ex-vivo* de perforina y granzima A en linfocitos T CD8+CD57+ y CD8+CD57- de pacientes con tuberculosis pulmonar. A. Las subpoblaciones purificadas fueron analizadas para la expresión intracelular de perforina y granzima A; los ensayos se realizaron sin estimulación antigénica. Los datos son expresados como medianas y rango-intercuartil (riq). B. Los linfocitos de ambas subpoblaciones fueron teñidos con el correspondiente testigo de isotipo (sombreado), anticuerpos anti-perforina y anti-granzima-A sin estimulación antigénica. Las imágenes son representativas de células de un paciente con tuberculosis pulmonar. \*  $p < 0.05$ .

## Expresión de IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$

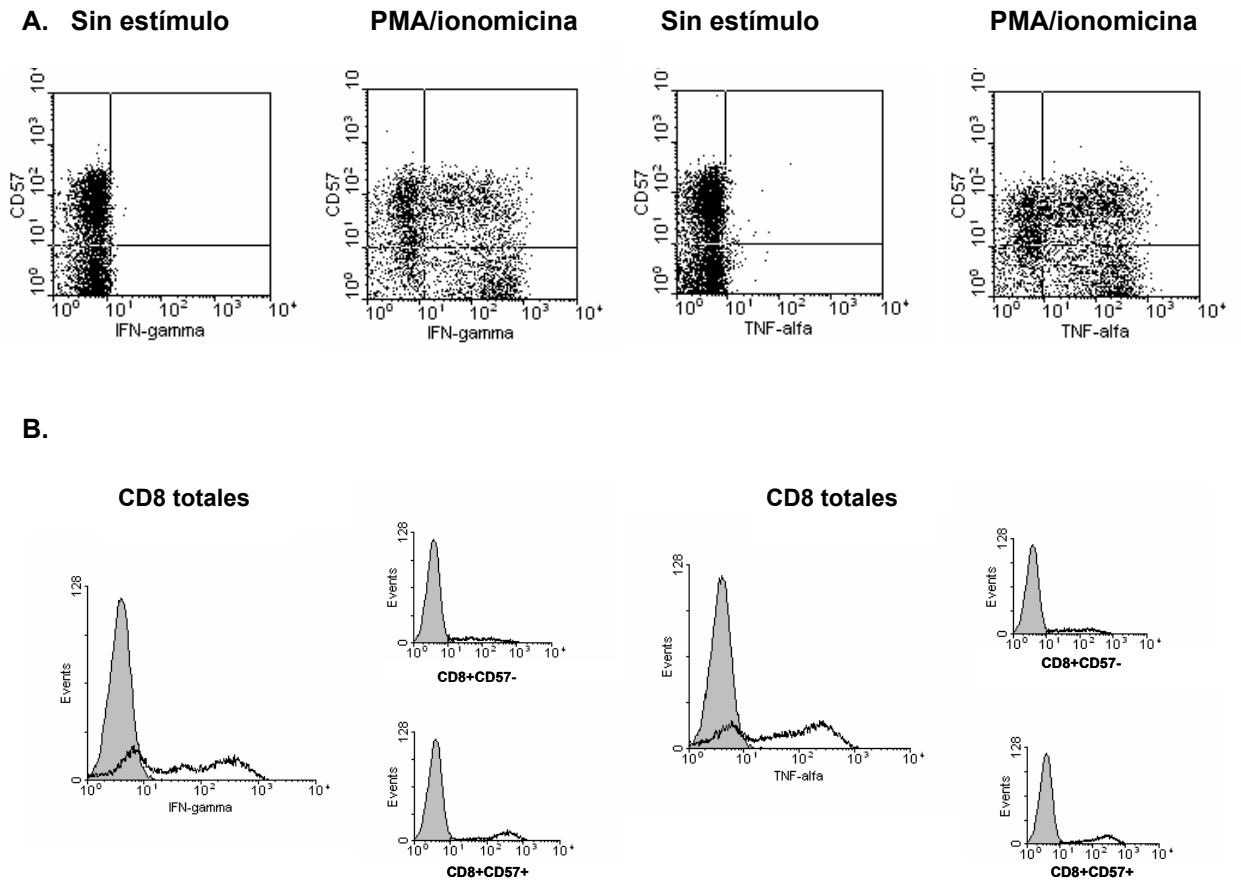
Para evaluar la producción de citocinas, estimulamos a las células con PMA/ionomicina e incubamos con brefeldina-A durante 4 horas. El siguiente cuadro muestra que los linfocitos T CD8+CD57+ fueron mas eficientes productores de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  que los linfocitos T CD8+CD57- en los dos grupos de estudio ( $p<0.001$ ). Sin embargo, al analizar únicamente la subpoblación de linfocitos T CD8+CD57+ no se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos estudiados (pacientes y individuos sanos), mientras que al analizar a los linfocitos T CD8+CD57- la diferencia fue de  $p<0.01$ .

Se muestra la expresión de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en linfocitos T CD8+CD57+ y CD8+CD57- tanto en pacientes como en controles. ns= no significativo.

Citocina	CD8+CD57+			CD8+CD57-		
	Pacientes n=5	Controles n=5	p	Pacientes n=5	Controles n=5	p
IFN- $\gamma$	63.5 $\pm$ 10.2	54.2 $\pm$ 7.5	ns	47.2 $\pm$ 2.7	16.6 $\pm$ 1.2	<0.01
TNF- $\alpha$	68.8 $\pm$ 6	63.9 $\pm$ 10.6	ns	36.9 $\pm$ 2.8	12.9 $\pm$ 2.3	<0.01

En la Figura 9A observamos la expresión intracelular de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en linfocitos T CD8+CD57+ *ex-vivo* y estimulados. En la Figura 9B se muestra densidad de expresión para ambas citocinas en linfocitos T CD8+ totales y en

las subpoblaciones de CD8+ después de haber estimulado con PMA/ionomicina.



**Figura 9.** Expresión intracelular de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en linfocitos T CD8+ totales estimulados con PMA/Ionomicina. A. Expresión de CD57, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en linfocitos T CD8+. Imagen representativa de un paciente con tuberculosis pulmonar. B. Los linfocitos T CD8+ fueron incubados con control de isotipo (sombreado) y con anticuerpos anti-CD57, anti- TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . El análisis se realizó en ventana para CD8. Las imágenes son representativas de un paciente con tuberculosis pulmonar.

## DISCUSION

La inmunidad celular en la infección por *Mycobacterium tuberculosis* juega un papel fundamental en el control de la infección. Una adecuada respuesta de los linfocitos T determina si la evolución es hacia infección latente o progresa a enfermedad tuberculosa. Por tal razón es que ha habido un creciente interés en determinar cuales subpoblaciones de linfocitos T median la inmunidad contra Mtb y de ellas, determinar cuales son blancos potenciales en el desarrollo de vacunas.

Existe redundancia en algunos de los mecanismos efectores que utilizan los linfocitos T CD4+ y los linfocitos T CD8+ para eliminar a Mtb, ya que ambos tipos de células son capaces de producir citocinas que activan a los macrófagos y utilizan la vía efectora dependiente de gránulos para eliminar a las células infectadas (7), sin embargo, median diferentes funciones en la inmunidad protectora. En años recientes se ha descrito que los linfocitos T CD8+ pueden expresar en su superficie, receptores característicos de las células NK (CD56, CD57, CD161), lo cual ha sido bien documentado en diversas circunstancias, principalmente en la etapa de inmunosenescencia [64] en donde se ha observado que el repertorio de los linfocitos T CD8+ es menos diverso debido a la acumulación de clones de linfocitos T CD8+ que expresan CD57 [38, 65] y en casos de infecciones virales de repetición originadas por virus como el CMV [66]. También se ha descrito que los linfocitos T CD4+ CD57+ expresan un fenotipo de memoria y que tienen la habilidad de producir citocinas de tipo Th1 cuando son estimulados con antígenos solubles de origen micobacteriano (52). En el presente trabajo analizamos las características



fenotípicas y funcionales de los linfocitos T CD8+CD57+ para inferir su potencial efector en la respuesta inmunológica.

Los resultados mostraron que la frecuencia de linfocitos T CD8+CD57+ fue significativamente mayor en el grupo de pacientes. Estos resultados son consistentes con los descritos por Fateminasab F-D y colaboradores en el año 2006, sin embargo, nuestro trabajo ofrece una caracterización mas detallada, no solo fenotípica, sino también funcional de la subpoblación CD8+CD57+ [67]. Hallazgos semejantes a los nuestros han sido encontrados en otras patologías como artritis reumatoide, infección por VIH o por CMV en donde se propone que la expansión de esta subpoblación puede ser resultado del estímulo constante con ciertos antígenos propios ó virales [46, 46, 68]. En este trabajo la gran mayoría de estos linfocitos T CD8+CD57+ mostraron un fenotipo caracterizado por expresión disminuida de CD28 y CD62L, expresión incrementada de CD44, importante actividad citotóxica *ex-vivo* en contra de monocitos autólogos y una significativa producción IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . La expresión diferencial de marcadores de superficie en los linfocitos T ha sido utilizada como una herramienta para caracterizar diversas subpoblaciones de linfocitos T vírgenes, de memoria y/o efectores. En el modelo murino, los linfocitos T CD8+ que muestran una pobre expresión de CD62L junto con una importante expresión de CD44, son considerados como efectores, mientras que aquellos linfocitos que expresan altos niveles de CD62L al igual que de CD44 (CD62L<sup>high</sup>, CD44<sup>high</sup>) se consideran de memoria central [69]. Sugimori N y colaboradores mostraron que en condiciones fisiológicas, cerca del 50% de los linfocitos T de sangre periférica en los humanos son CD62L+ y que este porcentaje disminuye después de la estimulación *in vitro* con citocinas [70].

Con respecto a las variaciones en la expresión de CD44 en CMN de sangre periférica en humanos, no existen datos definitivos, sin embargo, nosotros encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes y los individuos sanos que deben ser tomadas en consideración cuando se analizan los distintos marcadores en conjunto como CD62L, CD28 y CD57. Otro marcador que actualmente es utilizado para caracterizar las distintas subpoblaciones de linfocitos T CD8+ es CD45RA, nuestros resultados no mostraron diferencias en la expresión de CD45RA en ninguno de los grupos, y aunque este marcador no se asocia a una respuesta de memoria, su re-expresión se ha asociado con el grado de diferenciación de los linfocitos T CD8+ [71]. El perfil de expresión de los marcadores antes mencionados es consistente con lo que ha sido publicado por otros grupos que también han definido diversas subpoblaciones de linfocitos T CD8+ [72], Nosotros mostramos que analizar la expresión de los marcadores de superficie CD28, CD44 y CD45RA es una herramienta útil que permite identificar linfocitos T CD8+ efectores que han tenido experiencia antigénica [68, 73, 74].

Analizar la expresión de antígeno CD161 y el reconocimiento de la  $\alpha$ -GalCer presentada por tetrámeros de CD1d es la manera más precisa para definir que proporción de los linfocitos T CD8+CD57+ eran parte de los linfocitos NKT clásicos ó invariantes descrita por Godfrey D y colaboradores en el año 2004 [33]. La principal implicación inmunopatológica que tiene un análisis de este tipo, es desde luego la de poder identificar subpoblaciones linfocitarias restringidas por la molécula CD1 que tengan el potencial de participar en la defensa del hospedero contra Mtb [75, 76]. Ha sido descrito que algunos de los linfocitos NKT invariantes en humanos pueden expresar CD8 en

su superficie. Nuestros resultados mostraron que los linfocitos T CD8+CD57+, tanto del grupo de pacientes como del grupo de individuos sanos, expresó CD161 en la misma proporción que lo identificado por otros autores (72). La mayor expresión de CD161 se encontró en los linfocitos T CD8+CD57-, no se encontraron diferencias estadísticas entre los dos grupos. En estos experimentos no encontramos un reconocimiento significativo de la  $\alpha$ -GalCer en los 3 experimentos que realizamos; por lo tanto, solo podemos sugerir que la subpoblación CD8+CD57+ no pertenece al grupo de linfocitos NKT clásicos ó invariantes. Sin embargo, es importante mencionar que la identificación de linfocitos NKT es una tarea compleja ya que esta subpoblación tiene la capacidad de regular negativamente la expresión de su receptor invariante de superficie (TCR) después de ser expuestas a su ligando específico de modo que parecieran no estar presentes [77].

En virtud de que la principal función de los linfocitos T CD8+ en la tuberculosis pulmonar es la de lisis células infectadas para favorecer la eliminación del patógeno [7], decidimos analizar la actividad citotóxica de la subpoblación CD8+CD57+ bajo condiciones experimentales distintas; sin estímulo antigénico, estimulando con antígeno soluble de micobacteria, el FC-H37Rv y bloqueando la vía de presentación antigénica en moléculas de histocompatibilidad de clase I. Este ensayo tiene algunas características que es importante resaltar, la primera es que se utilizaron monocitos autólogos como células blanco y al mismo tiempo como presentadoras de antígeno (no profesionales), la segunda es que la relación que se utilizó es de 1 célula efectora por 1 célula blanco (1:1), de modo que no se sobreestimó su potencial actividad citotóxica y por último, estimulamos con antígenos solubles de Mtb.

Este tipo de antígenos son básicamente proteínas de secreción consideradas como los principales factores de virulencia de Mtb y que son ampliamente reconocidos por linfocitos T CD4+ y CD8+ [78, 79] La mayor parte de los ensayos que evalúan la actividad citotóxica de los linfocitos T utilizan relaciones efectora-blanco que van de 5:1 hasta 30:1, muchas veces esta es la relación óptima a la cual se puede obtener el resultado más evidente, sin embargo en nuestro caso, una limitante para hacer estos experimentos a diferentes relaciones es la pobre recuperación de esta subpoblación. Es importante considerar que tuvimos resultados estadísticamente significativos con una relación 1:1, lo cual sugiere la gran capacidad de lisis de dicha subpoblación. Durante los ensayos que evaluaron la citotoxicidad basal, los linfocitos T CD8+CD57+ de los pacientes con TB mostraron un mayor porcentaje de lisis contra los monocitos autólogos comparado con los linfocitos T CD8+CD57-, lo que sugiere que aun y cuando ambas subpoblaciones están siendo expuestas a los antígenos de Mtb, sólo los linfocitos T CD8+CD57+ llevan a cabo la citólisis. Existen varias posibles explicaciones para esta actividad citotóxica incrementada, dentro de la cuales y quizás una de las más importantes es la presencia de DNA micobacteriano en las células mononucleadas de los pacientes. Este hallazgo es semejante al publicado en el año 2000 por el Dr. Hernández-Pando, quien sugiere que aún los fagocitos no-profesionales pueden funcionar como reservorios para Mtb, por lo tanto como una fuente potencial de antígenos que activan a las células presentadoras para producir citocinas que a su vez activen al sistema inmune adaptativo [80]. Otra posibilidad es que conforme los linfocitos T CD8+CD57+ van siendo expuestos a los antígenos micobacterianos durante el proceso infeccioso, van también

adquiriendo de manera dinámica la expresión de algunos otros marcadores como el antígeno CD160 ó el antígeno 2B4 que se han asociados con una mayor capacidad de lisis [81]. Otra posibilidad es que los monocitos autólogos muestren una expresión disminuida de moléculas clase I en su superficie secundaria al proceso infeccioso de modo que predominen las señales de activación celular mediadas por receptores activadores de células NK (NKp30, NKG2D, 2B4, etc.) [82, 83]. Los linfocitos T CD8+CD57-, al no tener receptores de células NK en superficie, no realizan esta actividad citotóxica en condiciones basales. Cuando los ensayos de citotoxicidad se realizaron estimulando con FC-H37Rv observamos un comportamiento distinto, ambas subpoblaciones incrementaron su actividad citotóxica pero los linfocitos T CD8+CD57- son quienes mostraron el mayor porcentaje de lisis (en ambos grupos, pacientes e individuos sanos), mientras que los linfocitos T CD8+CD57+ parecen regular su incremento. Esto sugiere que los linfocitos T CD8+CD57- tienen gran capacidad de respuesta que puede ser utilizada contra células infectadas. Por otra parte, el poco incremento que observamos en la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+CD57+ ya había sido descrito previamente por Mollet L *et al* [52], en un modelo que evalúa la actividad citotóxica inducida por anticuerpos anti-CD3. Este tipo de actividad regulada podría no ser benéfico para el paciente con TB, ya que una respuesta citotóxica exagerada podría traducirse en mayor daño pulmonar. Igualmente importante es la presencia de subpoblaciones de linfocitos T CD8+ citotóxicos que gracias a la expresión de marcadores de NK pueden funcionar en la frontera de la respuesta inmune innata y la adquirida. Es importante considerar que parte de las funciones de la subpoblación CD8+ CD57+, puede ser la de optimizar la actividad de los

linfocitos T CD8<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> a través de la producción de citocinas, además de lisar células infectadas. Spina y colaboradores describen en el año 2000, que algunas subpoblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicos provenientes de pacientes VIH + tienen la capacidad de producir de manera importante factores solubles como el INF- $\gamma$  pero muestran una actividad citotóxica disminuida [84]. Con respecto a los resultados obtenidos al bloquear la molécula HLA-ABC, podemos concluir que en los individuos sanos la lisis específica fue mediada por moléculas clase I, mientras que esto no sucedió en los pacientes con tuberculosis, esto puede ser debido a que al bloquear las moléculas clase I de la superficie del monocito autólogo, predominaron aun más las señales de activación mediadas por receptores activadores de célula NK, lo cual se tradujo en mayor citotoxicidad celular [83].

Para conocer si la actividad citotóxica que observamos estaba o no mediada por la vía dependiente de gránulos, determinamos la expresión ex-vivo de los factores citotóxicos perforina y granzima A. Ambas moléculas están contenidas en los gránulos líticos especializados de las células NK y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> [85, 86] y han sido ampliamente estudiadas como parte de la inmunidad celular contra Mtb [87]. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> y los CD8<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> de los pacientes expresaron de manera significativa ambas moléculas (Figura 4A y 4B) comparado con los individuos sanos. Se ha descrito que la expresión de la granzima A y la perforina se encuentran en linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores de memoria y que la adquisición de estos marcadores es un proceso dinámico, de modo que es probable que en ausencia de infección, estos linfocitos T CD8<sup>+</sup> fueron Perforina<sup>-</sup>/Granzima-A<sup>-</sup>, posteriormente fueron Perforina<sup>+</sup>/Granzima-A<sup>-</sup> y por último Perforina<sup>+</sup>/Granzima-A<sup>+</sup> [88]. Esto

nuevamente confirma que la subpoblación CD8+CD57+ es efectora y que al tener un incremento mayor que la subpoblación CD8+CD57- sugiere que ésta puede ser una de las vías que utiliza para lisar células infectadas, mientras que los linfocitos CD8+CD57- pueden estar utilizando otros mecanismos adicionales.

Por último, analizamos la expresión de dos citocinas que median funciones importantes en la inmunopatogénesis de la tuberculosis, el INF- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ . El IFN- $\gamma$  es la principal citocina involucrada en la activación de los macrófagos [89], mientras que el TNF- $\alpha$  actúa como un factor quimiotáctico para atraer macrófagos y linfocitos T al pulmón, además de favorecer la formación del granuloma [90]. Los resultados mostraron que los linfocitos T CD8+CD57+ fueron los principales productores de ambas citocinas en nuestros ensayos *in vitro*, no encontrándose diferencias estadísticas entre pacientes y individuos sanos, lo cual sugiere que este perfil de secreción de citocinas puede ser una característica de la subpoblación independientemente del estado de salud/enfermedad de los individuos.

En conclusión, consideramos que la expansión de los linfocitos T CD8+CD57+ en los pacientes con tuberculosis puede tener impacto en la eliminación del bacilo, ya que estos linfocitos muestran actividad citotóxica espontánea en contra de monocitos autólogos, mayor concentración de gránulos citotóxicos y una adecuada producción de INF- $\gamma$ . Con estos resultados consideramos que el siguiente paso en el conocimiento de esta subpoblación debe ser determinar su especificidad antigénica y su comportamiento en relación con los linfocitos T CD8+CD57- a lo largo de la historia natural de la enfermedad. Las características que expresa esta subpoblación son algunas de las que se

buscan en los nuevos marcadores subrogados de activación celular para el diseño de nuevas vacunas contra Mtb. El comportamiento de estas subpoblaciones de linfocitos T CD8+ citotóxicos en estudios longitudinales darán mayor información sobre su papel dentro de la inmunopatogénesis de la enfermedad.

## CONCLUSIONES

1. Los pacientes con tuberculosis pulmonar tienen 11.8% más linfocitos T CD8+CD57+ que los individuos control.
2. El fenotipo de los linfocitos T CD8+CD57+ se caracteriza por los siguientes marcadores de superficie:  
CD28(-), CD44 (+), CD45RA intermedio, CD62L (-), Perforina (+) y Granzima(+).
3. Los linfocitos T CD8+CD57+ ejercen citotoxicidad en forma espontánea contra sus monocitos autólogos en ausencia de antígeno.
4. El incremento en la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+CD57+ fue menor que el de su contraparte CD57- en presencia de antígeno.
5. La citotoxicidad de los linfocitos T CD8+CD57+ de pacientes con TB no se inhibió cuando el MHC-I fue bloqueado con el anticuerpo anti-HLA-ABC.



## Referencias

1. Frothingham R, Stout JE, Hamilton CD. Current issues in global tuberculosis control. *Int J Infect Dis* 2005;9:297-311.
2. Kaufmann SH. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis* 2002;61 Suppl 2:ii54-ii58.
3. Cowley SC, Elkins KL. CD4+ T cells mediate IFN-gamma-independent control of Mycobacterium tuberculosis infection both in vitro and in vivo. *J Immunol* 2003;171:4689-99.
4. Derrick SC, Repique C, Snoy P, Yang AL, Morris S. Immunization with a DNA vaccine cocktail protects mice lacking CD4 cells against an aerogenic infection with Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 2004;72:1685-92.
5. Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)* 2004;84:93-101.
6. Fremont C, Allie N, Dambuza I, et al. Membrane TNF confers protection to acute mycobacterial infection. *Respir Res* 2005;6:136.
7. Lazarevic V, Flynn J. CD8+ T cells in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1116-21.
8. Grotzke JE, Lewinsohn DM. Role of CD8+ T lymphocytes in control of Mycobacterium tuberculosis infection. *Microbes Infect* 2005;7:776-88.
9. Orme IM, Collins FM. Adoptive protection of the Mycobacterium tuberculosis-infected lung. Dissociation between cells that passively transfer protective immunity and those that transfer delayed-type hypersensitivity to tuberculin. *Cell Immunol* 1984;84:113-20.
10. Sousa AO, Mazzaccaro RJ, Russell RG, et al. Relative contributions of distinct MHC class I-dependent cell populations in protection to tuberculosis infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4204-8.
11. Behar SM, Dascher CC, Grusby MJ, Wang CR, Brenner MB. Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med* 1999;189:1973-80.
12. Kaufmann SH, Schaible UE. Antigen presentation and recognition in bacterial infections. *Curr Opin Immunol* 2005;17:79-87.
13. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med* 1993;178:2249-54.
14. Keane J, Gershon S, Wise RP, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 2001;345:1098-104.

15. Skold M, Xiong X, Illarionov PA, Besra GS, Behar SM. Interplay of cytokines and microbial signals in regulation of CD1d expression and NKT cell activation. *J Immunol* 2005;175:3584-93.
16. Kamath AB, Woodworth J, Xiong X, Taylor C, Weng Y, Behar SM. Cytolytic CD8+ T cells recognizing CFP10 are recruited to the lung after *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 2004;200:1479-89.
17. Temmerman ST, Place S, Debie AS, Loch C, Mascart F. Effector functions of heparin-binding hemagglutinin-specific CD8+ T lymphocytes in latent human tuberculosis. *J Infect Dis* 2005;192:226-32.
18. Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, et al. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science* 1997;276:1684-7.
19. Lewinsohn DA, Heinzl AS, Gardner JM, Zhu L, Alderson MR, Lewinsohn DM. *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cells preferentially recognize heavily infected cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:1346-52.
20. Kaufmann SH. Cell-mediated immunity: dealing a direct blow to pathogens. *Curr Biol* 1999;9:R97-R99.
21. Hanson DA, Kaspar AA, Poulain FR, Krensky AM. Biosynthesis of granulysin, a novel cytolytic molecule. *Mol Immunol* 1999;36:413-22.
22. Ogasawara J, Suda T, Nagata S. Selective apoptosis of CD4+CD8+ thymocytes by the anti-Fas antibody. *J Exp Med* 1995;181:485-91.
23. Li-Weber M, Krammer PH. Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. *Semin Immunol* 2003;15:145-57.
24. Nadiri A, Wolinski MK, Saleh M. The inflammatory caspases: key players in the host response to pathogenic invasion and sepsis. *J Immunol* 2006;177:4239-45.
25. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233-58.
26. Yewdell JW, Reits E, Neefjes J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 2003;3:952-61.
27. Antoniou AN, Powis SJ, Elliott T. Assembly and export of MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol* 2003;15:75-81.
28. Porcelli SA, Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* 1999;17:297-329.

29. Moody DB, Besra GS. Glycolipid targets of CD1-mediated T-cell responses. *Immunology* 2001;104:243-51.
30. Moody DB, Ulrichs T, Muhlecker W, et al. CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nature* 2000;404:884-8.
31. Skold M, Behar SM. Role of CD1d-restricted NKT cells in microbial immunity. *Infect Immun* 2003;71:5447-55.
32. Gadola SD, Dulphy N, Salio M, Cerundolo V. Valpha24-JalphaQ-independent, CD1d-restricted recognition of alpha-galactosylceramide by human CD4(+) and CD8alphabeta(+) T lymphocytes. *J Immunol* 2002;168:5514-20.
33. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van KL. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 2004;4:231-7.
34. Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol* 2005;23:877-900.
35. Winau F, Hegasy G, Kaufmann SH, Schaible UE. No life without death-apoptosis as prerequisite for T cell activation. *Apoptosis* 2005;10:707-15.
36. Ackerman AL, Cresswell P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol* 2004;5:678-84.
37. Winau F, Weber S, Sad S, et al. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity* 2006;24:105-17.
38. Morley JK, Batliwalla FM, Hingorani R, Gregersen PK. Oligoclonal CD8+ T cells are preferentially expanded in the CD57+ subset. *J Immunol* 1995;154:6182-90.
39. Appay V, Dunbar PR, Callan M, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 2002;8:379-85.
40. Le PY, Puthier D, Lecureuil C, et al. High cytotoxic and specific migratory potencies of senescent CD8+ CD57+ cells in HIV-infected and uninfected individuals. *J Immunol* 2006;177:5145-54.
41. Crawford DH, Brickell P, Tidman N, McConnell I, Hoffbrand AV, Janossy G. Increased numbers of cells with suppressor T cell phenotype in the peripheral blood of patients with infectious mononucleosis. *Clin Exp Immunol* 1981;43:291-7.
42. Schooley RT, Hirsch MS, Colvin RB, et al. Association of herpesvirus infections with T-lymphocyte-subset alterations, glomerulopathy, and opportunistic infections after renal transplantation. *N Engl J Med* 1983;308:307-13.

43. Kurumagawa T, Seki S, Kobayashi H, et al. Characterization of bronchoalveolar lavage T cell subsets in sarcoidosis on the basis of CD57, CD4 and CD8. *Clin Exp Immunol* 2003;133:438-47.
44. Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol* 1983;131:1789-96.
45. Takayama E, Koike Y, Ohkawa T, et al. Functional and Vbeta repertoire characterization of human CD8+ T-cell subsets with natural killer cell markers, CD56+. *Immunology* 2003;108:211-9.
46. Maeda T, Yamada H, Nagamine R, et al. Involvement of CD4+,CD57+ T cells in the disease activity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:379-84.
47. Wang EC, Taylor-Wiedeman J, Perera P, Fisher J, Borysiewicz LK. Subsets of CD8+, CD57+ cells in normal, healthy individuals: correlations with human cytomegalovirus (HCMV) carrier status, phenotypic and functional analyses. *Clin Exp Immunol* 1993;94:297-305.
48. Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, et al. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 2000;192:63-75.
49. Hamann D, Baars PA, Rep MH, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med* 1997;186:1407-18.
50. Pittet MJ, Speiser DE, Valmori D, Cerottini JC, Romero P. Cutting edge: cytolytic effector function in human circulating CD8+ T cells closely correlates with CD56 surface expression. *J Immunol* 2000;164:1148-52.
51. Azuma M, Phillips JH, Lanier LL. *J Immunol* 1993;150:1147-59.
52. Mollet L, Sadat-Sowti B, Duntze J, et al. CD8hi+CD57+ T lymphocytes are enriched in antigen-specific T cells capable of down-modulating cytotoxic activity. *Int Immunol* 1998;10:311-23.
53. Garland RJ, El-Shanti N, West SE, et al. Human CD8+ CTL recognition and in vitro lysis of herpes simplex virus-infected cells by a non-MHC restricted mechanism. *Scand J Immunol* 2002;55:61-9.
54. Schmidt-Wolf GD, Negrin RS, Schmidt-Wolf IG. Activated T cells and cytokine-induced CD3+CD56+ killer cells. *Ann Hematol* 1997;74:51-6.
55. Linn YC, Hui KM. Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytolytic specificity against leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003;44:1457-62.

56. Khan N, Shariff N, Cobbold M, et al. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol* 2002;169:1984-92.
57. Jimenez-Martinez MC, Linares M, Baez R, et al. Intracellular expression of interleukin-4 and interferon-gamma by a Mycobacterium tuberculosis antigen-stimulated CD4+ CD57+ T-cell subpopulation with memory phenotype in tuberculosis patients. *Immunology* 2004;111:100-6.
58. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1376-95.
59. Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol* 1976;Suppl 5:9-15.
60. Kumagai K, Itoh K, Hinuma S, Tada M. Pretreatment of plastic Petri dishes with fetal calf serum. A simple method for macrophage isolation. *J Immunol Methods* 1979;29:17-25.
61. Hermans IF, Silk JD, Yang J, et al. The VITAL assay: a versatile fluorometric technique for assessing CTL- and NKT-mediated cytotoxicity against multiple targets in vitro and in vivo. *J Immunol Methods* 2004;285:25-40.
62. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993;159:197-207.
63. Eisenach KD, Sifford MD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:1160-3.
64. Miyaji C, Watanabe H, Minagawa M, et al. Numerical and functional characteristics of lymphocyte subsets in centenarians. *J Clin Immunol* 1997;17:420-9.
65. Schwab R, Szabo P, Manavalan JS, et al. Expanded CD4+ and CD8+ T cell clones in elderly humans. *J Immunol* 1997;158:4493-9.
66. Wang EC, Moss PA, Frodsham P, Lehner PJ, Bell JI, Borysiewicz LK. CD8highCD57+ T lymphocytes in normal, healthy individuals are oligoclonal and respond to human cytomegalovirus. *J Immunol* 1995;155:5046-56.
67. Fateminasab FD, Shahgasempour S, Mirsaeidi SM, Tabarsi P, Mansoori SD, Entezami Z. Increased activation and expansion of a CD57+ subset within peripheral CD8+ T lymphocytes in Mycobacterium tuberculosis-infected patients. *Arch Iran Med* 2006;9:53-7.

68. Wood KL, Knox KS, Wang Y, Day RB, Schnizlein-Bick C, Twigg HL, III. Apoptosis of CD57+ and. *Clin Immunol* 2005;117:294-301.
69. van FH, Saldanha M, Gilbertson D, Dudani R, Krishnan L, Sad S. Reducing the stimulation of CD8+ T cells during infection with intracellular bacteria promotes differentiation primarily into a central (CD62LhighCD44high) subset. *J Immunol* 2005;174:5341-50.
70. Sugimori N, Nakao S, Yachie A, et al. Administration of G-CSF to normal individuals diminishes L-selectin+ T cells in the peripheral blood that respond better to alloantigen stimulation than L-selectin- T cells. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:119-24.
71. Champagne P, Ogg GS, King AS, et al. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 2001;410:106-11.
72. Appay V, Dunbar PR, Callan M, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 2002;8:379-85.
73. Kanegane H, Kasahara Y, Niida Y, et al. Expression of L-selectin (CD62L) discriminates Th1- and Th2-like cytokine-producing memory CD4+ T cells. *Immunology* 1996;87:186-90.
74. Fanning A, Volkov Y, Freeley M, Kelleher D, Long A. CD44 cross-linking induces protein kinase C-regulated migration of human T lymphocytes. *Int Immunol* 2005;17:449-58.
75. Yu KO, Porcelli SA. The diverse functions of CD1d-restricted NKT cells and their potential for immunotherapy. *Immunol Lett* 2005;100:42-55.
76. Miyake S, Yamamura T. Therapeutic potential of glycolipid ligands for natural killer (NK) T cells in the suppression of autoimmune diseases. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005;5:315-22.
77. Parekh VV, Wilson MT, Olivares-Villagomez D, et al. Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice. *J Clin Invest* 2005;115:2572-83.
78. Tan T, Lee WL, Alexander DC, Grinstein S, Liu J. The ESAT-6/CFP-10 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates phagosome maturation. *Cell Microbiol* 2006;8:1417-29.
79. Kamath A, Woodworth JS, Behar SM. Antigen-specific CD8+ T cells and the development of central memory during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 2006;177:6361-9.
80. Hernandez-Pando R, Jeyanathan M, Mengistu G, et al. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet* 2000;356:2133-8.

81. Rey J, Giustiniani J, Mallet F, et al. The co-expression of 2B4 (CD244) and CD160 delineates a subpopulation of human CD8+ T cells with a potent CD160-mediated cytolytic effector function. *Eur J Immunol* 2006;36:2359-66.
82. Watzl C. The NKG2D receptor and its ligands-recognition beyond the "missing self"? *Microbes Infect* 2003;5:31-7.
83. Sandusky MM, Messmer B, Watzl C. Regulation of 2B4 (CD244)-mediated NK cell activation by ligand-induced receptor modulation. *Eur J Immunol* 2006;36:3268-76.
84. Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, et al. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 2000;192:63-75.
85. Hochegger K, Eller P, Rosenkranz AR. Granzyme A: an additional weapon of human polymorphonuclear neutrophils (PMNs) in innate immunity? *Blood* 2004;103:1176.
86. Wagner C, Iking-Konert C, Deneffle B, Stegmaier S, Hug F, Hansch GM. Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* 2004;103:1099-104.
87. Bratke K, Kuepper M, Bade B, Virchow JC, Jr., Luttmann W. Differential expression of human granzymes A, B, and K in natural killer cells and during CD8+ T cell differentiation in peripheral blood. *Eur J Immunol* 2005;35:2608-16.
88. Takata H, Takiguchi M. Three memory subsets of human CD8+ T cells differently expressing three cytolytic effector molecules. *J Immunol* 2006;177:4330-40.
89. Turner J, Orme IM. The expression of early resistance to an infection with *Mycobacterium tuberculosis* by old mice is dependent on IFN type II (IFN-gamma) but not IFN type I. *Mech Ageing Dev* 2004;125:1-9.
90. Bean AG, Roach DR, Briscoe H, 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;162:3504-11.