

Inmunorregulación en pacientes tuberculosos

Alfonso E. Islas, Celso García, Ignacio Rayón, Celso Ramos y Librado Ortiz-Ortiz*

Introducción

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa causada generalmente por *Mycobacterium tuberculosis*, menos frecuentemente por *M. bovis* y rara vez por *M. avium*. El agente causal se adquiere la mayoría de las veces por inhalación y por tanto el órgano de choque más afectado es el pulmón. Este órgano le brinda a estas micobacterias el terreno ideal para su implante y reproducción, ya que ofrece las condiciones de irrigación sanguínea y de aereación necesarias. Se considera que las formas extrapulmonares del padecimiento son el resultado de diseminaciones de las formas pulmonares.

En países desarrollados la tuberculosis no representa un problema de salud pública, sin embargo, en países en desarrollo esta enfermedad constituye un serio problema de salud.¹

El Instituto Nacional de Enfermedades Pulmonares de la S.S.A., INEP, cuenta con 575 camas, de las cuales 247 (43%) se dedican a enfermos con tuberculosis pulmonar. Esto es importante si consideramos que se trata de un hospital de concentración nacional que puede constituir una muestra representativa del país.

Dada la alta prevalencia de la tuberculosis en México, la posibilidad de infectarse se presenta desde la infancia. En ocasiones la enfermedad crónica, tanto pulmonar como de otros órganos, se desarrolla como un resultado de la primoinfección. Sin embargo, en la mayoría de los casos esta primoinfección se resuelve a favor del huésped quedando como antecedente único la sensibilización, la cual se manifiesta cuando el huésped se pone en con-

tacto con el derivado protéico purificado (PPD).²

Las reacciones de inmunidad celular, como la hipersensibilidad tardía o de tipo IV,^{3,4} juegan un papel muy importante en este padecimiento. Según algunos autores, la presencia de inmunosupresión producida entre otros mecanismos por células supresoras, puede ser la responsable de la evolución crónica adversa que presenta la tuberculosis. Se han involucrado en estos procesos a los linfocitos derivados del timo (T) que presentan receptores para la porción Fc de la IgG y a las células adherentes, como los monocitos esterase positivos.^{5,7}

El objetivo de este estudio es determinar la actividad funcional de los linfocitos T y de las células con propiedades inmunosupresoras de pacientes tuberculosos.

Material y métodos

Pacientes. Se seleccionaron 50 pacientes tuberculosos de ambos sexos, en base al diagnóstico clínico, al radiológico y a la bacilosco-pía positiva, la cual se confirmó por cultivo; en algunos casos se agruparon de acuerdo a su reactividad al PPD.

Purificación de linfocitos y monocitos. Se obtuvieron células mononucleares de 10 ml de sangre heparinizada (20 U/ml) por el método de Boyum⁸ con ficol-hipaque. En algunos experimentos las células mononucleares se separaron en base a su adherencia al plástico; con este objeto las células mononucleares se ajustaron a una concentración de 3×10^6 células por ml en el medio de McCoy modificado, enriquecido con 10 por ciento de suero fetal bovino inactivado y se cultivaron en cajas de Petri durante 60 min a 37°C. Las células adherentes de la primera caja, se lavaron exhaustivamente con solución salina balanceada (SSB), se despegaron con un gendarme y se

* Departamentos de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco y del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.; Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de la S.S.A.

Tabla I. Determinación de linfocitos T y linfocitos T supresores en pacientes tuberculosos.

Grupo	Linfocitos	
	T	T supresores
Enfermos	25.4 ± 5.0	23.4 ± 10.0
Controles	49.5 ± 8.4	18.6 ± 9.0
	(P<0.05)	(P<0.15)

^a La determinación de linfocitos T se llevó a cabo por el método de formación de rosetas con eritrocitos de carnero.

^b La determinación de linfocitos T supresores se realizó por el método de formación de rosetas usando eritrocitos de pollo cubiertos con IgG de conejo (ver *Material y Métodos*).

ajustaron para su uso en los experimentos de cultivo.⁵

La riqueza de las células adherentes en monocitos circulantes con características de macrófagos,⁹ se determinó por medición de su actividad esterasa inespecífica, la cual fue de 75 por ciento. La presencia de células derivadas de la médula ósea (B) es esta población, determinada por inmunofluorescencia fue del 5 por ciento. Por otra parte, las células no adherentes se ensayaron con eritrocitos de carnero para determinar su capacidad de formar rosetas; esta población contenía 80 por ciento de células T.

Mitógeno. Concanavalina A (Con A) (Sigma Chemical Co., Saint Louis, Mo.), se usó a una concentración de 5 g/ml de cultivo.

Antígeno. La intradermorreacción se realizó en el antebrazo con 2 U de PPD (Laboratorio de Higiene de la Secretaría de Salubridad y Asistencia, México).

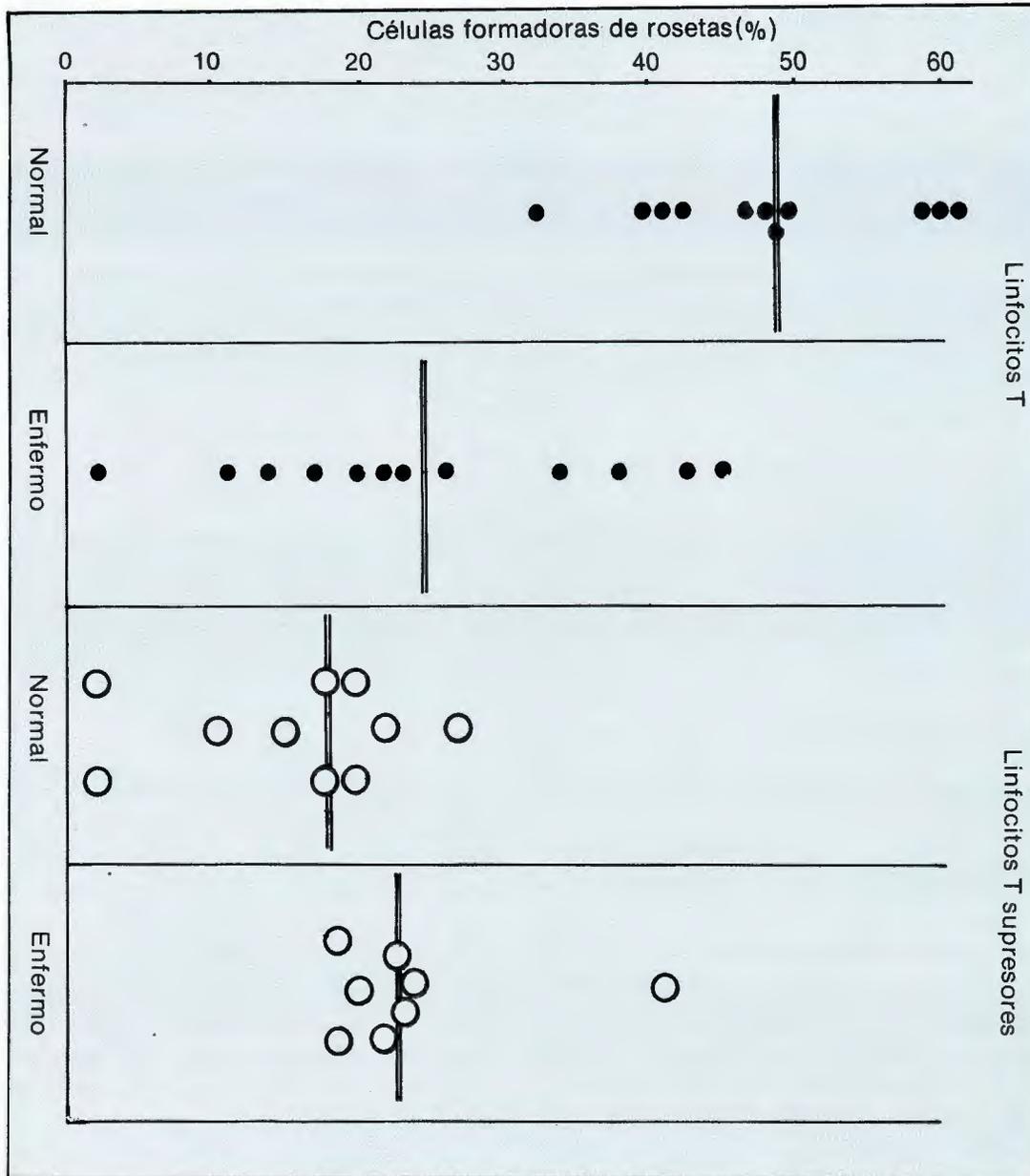
Rosetas T. Los linfocitos T se identificaron por la formación de rosetas espontáneas con eritrocitos de carnero.¹⁰

Rosetas T supresoras. Las células T con receptores para la fracción Fc de IgG (T_G) se determinaron por su capacidad de formar rosetas con eritrocitos de pollo sensibilizados con IgG de conejo antieritrocito de pollo.¹¹ Con este objeto las células linfoides se incubaron con los eritrocitos sensibilizados durante 30 min a 37°C. Los eritrocitos se lavaron tres veces y se resuspendieron en SSB; finalmente se hicieron reaccionar con los linfocitos en estudio en una proporción de 100:1.

Determinación de linfocitos B. Los linfocitos B se determinaron por inmunofluorescencia con antisueros anti: IgG, IgA o IgD (Hoechst, México), marcados con isotiocianato de fluoresceína y observados en un microscopio Leitz, con fuente de mercurio, a una longitud de onda de 260 nm.

Cultivo de células estimuladas con Con A. Los linfocitos de sangre periférica se cultivaron en microplacas Falcon (No. 3040, Falcon Plastics, Oxnard, Calif.), a una concentración de 2 × 10⁵ células por cultivo, en un volumen de 0.1 ml de medio, en presencia o ausencia de

Fig. 1. Distribución de linfocitos T y T supresores en enfermos tuberculosos y en individuos sanos.



la cantidad apropiada del mitógeno. El medio de cultivo consiste en Mc Coy modificado con 10 por ciento de suero fetal bovino suplementado con 50 U de penicilina y 50 μ g de estreptomina por ml. La incubación se llevó a cabo por tres días en una atmósfera de 5 por ciento de CO_2 ; a las 48 h a cada pozo de cultivo se le administró un pulso de 1 μ Ci de ^3H -timidina (^3H -TdR) y 18 h más tarde las células se colectaron en un cosechador Bran-

del. Los filtros se secaron por calor y se colocaron en botellas con 3 ml de líquido de centelleo. Además se hicieron cocultivos entre células mononucleares de sujetos normales (N) y células mononucleares (E), células adherentes (Adh) y no adherentes (No Adh) de pacientes tuberculosos.

Resultados

Determinación de linfocitos T en pacientes

Tabla II. Respuesta de linfocitos de pacientes con tuberculosis pulmonar a la Con A

Paciente	% respuesta	Paciente	% respuesta
1	221	11	30
2	446	12	16
3	11	13	232
4	87	14	2
5	16	16	52
6	23	17	49
7	45	18	89
8	11	24	19
9	86	25	95
10	62		
Promedio: 83.8			

tuberculosos. La enumeración de linfocitos T por el método de las rosetas mostró que los sujetos tuberculosos con prueba PPD negativa, tenían una menor cantidad (25%) de dichas células que los sujetos normales (49%) (Tabla I y Fig. 1). la diferencia entre ambos grupos es significativa ($P < 0.05$).

Determinación de linfocitos T supresores en pacientes tuberculosos. Al estudiar la subpoblación de linfocitos con receptores para la porción Fc de la IgG, se encontró un valor similar en los enfermos y en los sujetos sanos. Sin embargo, los resultados indican que la mayoría de las células T en dichos pacientes

corresponden al tipo supresor (Tabla I y Fig. 1).

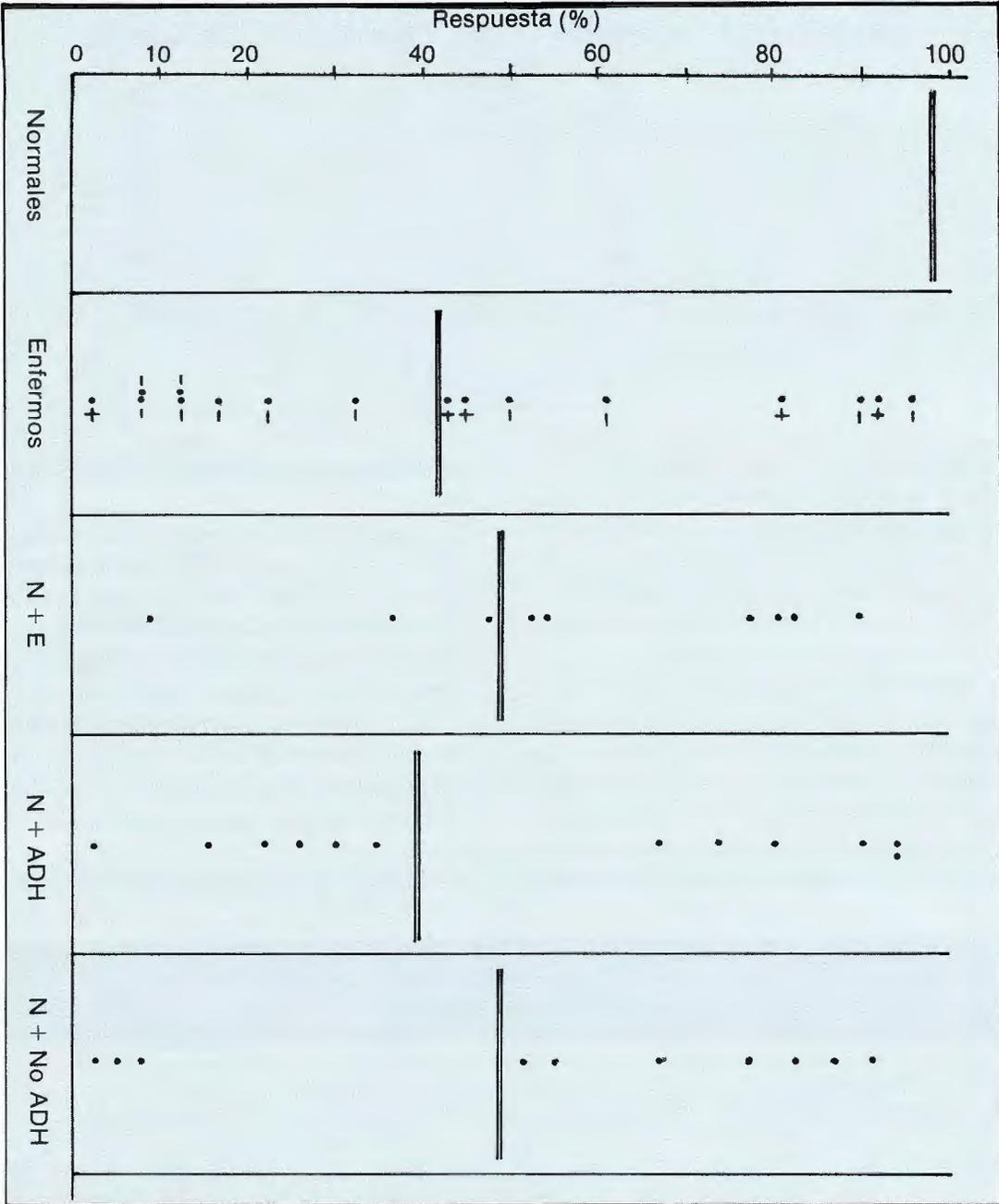
Respuesta de linfocitos de pacientes tuberculosos a la Con A. Los linfocitos de pacientes tuberculosos muestran en general una respuesta disminuida a la Con A. De 19 muestras analizadas en su respuesta al mitógeno, 15 mostraron una respuesta disminuida ($P < 0.001$). Solamente una dio una respuesta normal (paciente 25) y tres de ellos una respuesta mucho mayor que la de sus respectivos controles normales (pacientes 1, 2 y 13) (Tabla II).

Respuesta de linfocitos de pacientes tuber-

Tabla III. Respuesta de linfocitos obtenidos en pacientes con tuberculosis pulmonar a la Con A: comparación entre pacientes con una prueba dérmica al PPD positiva o negativa.

Paciente con PPD positivo	% respuesta	Paciente con PPD negativo	% respuesta
1	221	4	87
2	446	6	23
3	11	8	11
5	16	10	62
7	45	11	30
9	86	12	16
13	232	14	2
17	49	16	52
18	89	24	19
Promedio	132.0 ^a	Promedio	32.5 ^a
^a La diferencia en la respuesta de ambos grupos a la Con A es significativa ($P < 0.05$).			

Fig. 2. Cocultivos de células de pacientes tuberculosos con células de sujetos sanos y su respuesta a la Con A. El signo + o — representa la reactividad al PPD.



culosos con una prueba PPD positiva o negativa, a la Con A. Cuando se agruparon los pacientes tuberculosos de acuerdo a su reactividad cutánea al PPD, se observó que los pacientes con una intradermorreacción positiva mostraban una respuesta usualmente mayor que la de sus controles normales (132%), mientras que, los linfocitos de pacientes con

una reacción negativa al PPD (anérgicos) presentaban una respuesta significativamente menor ($P < 0.05$) que la de sus respectivos controles (33.5%) (Tabla III).

Estudio del efecto de células mononucleares, células adherentes y células no adherentes de enfermos tuberculosos sobre las células mononucleares de sujetos normales, cuando

se cocultivan en presencia de la Con A. Con el objeto de determinar si en las células mononucleares de pacientes tuberculosos existía una población celular responsable de la disminución en la respuesta a la Con A, se realizaron cocultivos con células mononucleares de individuos sin antecedentes clínicos ni de laboratorio de tuberculosis. Los cocultivos de células de individuos sanos con las células mononucleares completas, las células adherentes o las células no adherentes de pacientes tuberculosos mostraron un rango variable de respuesta. Sin embargo, la tendencia fue a mostrar una disminución en la respuesta a la Con A (Fig. 2). El promedio en todos los casos fue de un 40 a un 50 por ciento de respuesta. Tanto la población total como las células adherentes y las no adherentes suprimieron la respuesta de las células mononucleares de sujetos sanos. Por el contrario, el cocultivo de las células de dos individuos sanos no mostró supresión y lo que se observó fue una tendencia a mostrar un efecto aditivo.

Con el objeto de ilustrar el efecto supresor de las poblaciones celulares mencionadas, presentamos algunos resultados individuales. En la Fig. 3 se puede observar la respuesta de los linfocitos de un enfermo tuberculoso a la Con A, la cual es dramáticamente diferente de la del sujeto sano. Tanto las células adherentes como las no adherentes del mismo no responden al mitógeno. Cuando se adicionan tanto las células mononucleares totales (E) como las células adherentes o las no adherentes, se aprecia una supresión de la respuesta al mitógeno. Es decir, en este paciente existen células supresoras en poblaciones celulares adherentes y en las no adherentes.

En la Fig. 4 se puede ver cómo las células totales (E) o las adherentes suprimen la respuesta de las células de sujetos sanos a la Con A. En este caso, el cocultivo de células no adherentes de los pacientes con las células normales muestran un efecto aditivo similar a la del cocultivo de células de dos individuos sanos.

Finalmente, en la Fig. 5 se presenta un resumen de los resultados obtenidos con los cocultivos de células de pacientes tuberculosos con las de individuos sanos. La Fig. 5A muestra la respuesta de los linfocitos de pa-

cientes tuberculosos y de sujetos sanos a la Con A, donde se observa la respuesta disminuida de los primeros.

Cuando se cocultivan células de sujetos sanos se observa un efecto aditivo. (Fig. 5B); mientras que cuando se cocultivan células de pacientes con células de individuos sanos se presenta una supresión en la respuesta al mitógeno (Fig. 5C). Asimismo, cuando se mezclan células de individuos normales con células adherentes (Fig. 5D) o células no adherentes (Fig. 5E) de enfermos tuberculosos, se pone de manifiesto el efecto supresor a la respuesta mitogénica. Estos resultados indican que en una población celular de pacientes con tuberculosis existen células con propiedades supresoras tanto en poblaciones adherentes (monocitos) como en aquellas no adherentes (linfocitos T y/o B).

Discusión

Los resultados aquí presentados nos indican que pacientes con tuberculosis crónica avanzada y con prueba negativa al PPD muestran una deficiencia de linfocitos T. Además, estos pacientes tienen un número de células T supresoras que parece corresponder al total de los linfocitos T del enfermo. La disminución en el número de células efectoras o el aumento relativo de células T supresoras podría explicar la anergia observada no solamente contra el PPD, sino también para otros antígenos que se usan para poner de manifiesto la hipersensibilidad de tipo tardío. Dentro del grupo de enfermos anérgicos se encontraron unos que mostraron una respuesta disminuida a la Con A y otros que la presentaron normal o elevada al mitógeno. El primer tipo presentó además la propiedad de inhibir la respuesta de células de individuos normales a la Con A. Esta supresión se observó en algunos casos con las células totales, en otros con las células adherentes y además con células no adherentes. Es interesante mencionar que varios pacientes presentaron los dos tipos de células supresoras. Además, tenemos evidencias de que existe una relación entre la respuesta de las células de pacientes tuberculosos a la Con A y el estado clínico de los mismos (manuscrito en preparación); en este caso existe una tendencia a responder en forma

Fig. 3. Cocultivo de células mononucleares, adherentes y no adherentes de un paciente tuberculoso con células linfoides de un sujeto sano y su respuesta a la Con A. Obsérvese cómo solamente las células adherentes suprimen la respuesta de las células normales.

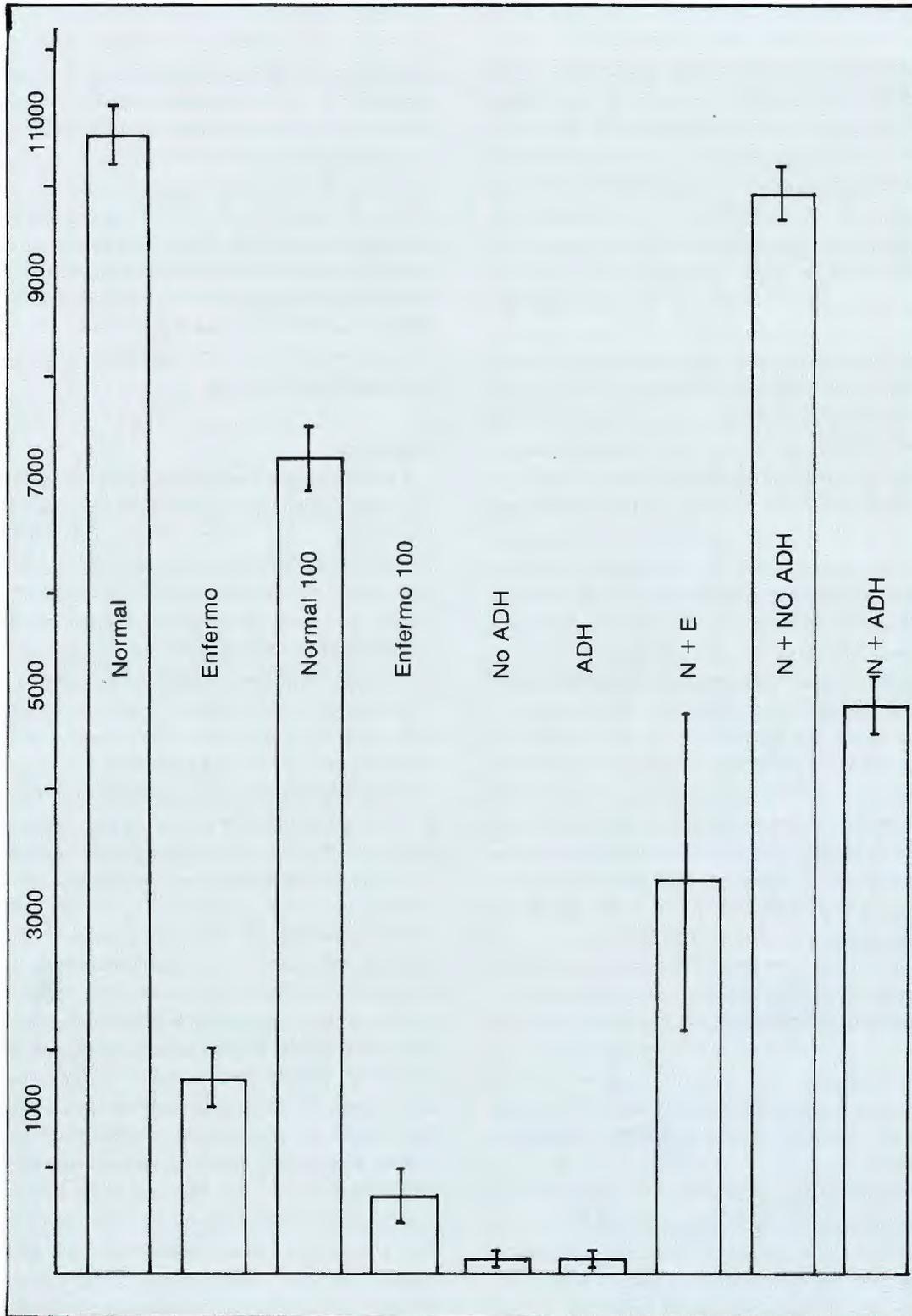


Fig. 4. Cocultivo de células mononucleares, adherentes y no adherentes de un paciente tuberculoso con células linfoides de un sujeto sano y su respuesta a la Con A. Obsérvese cómo tanto las células adherentes como las no adherentes suprimen la respuesta de las células de un individuo normal.

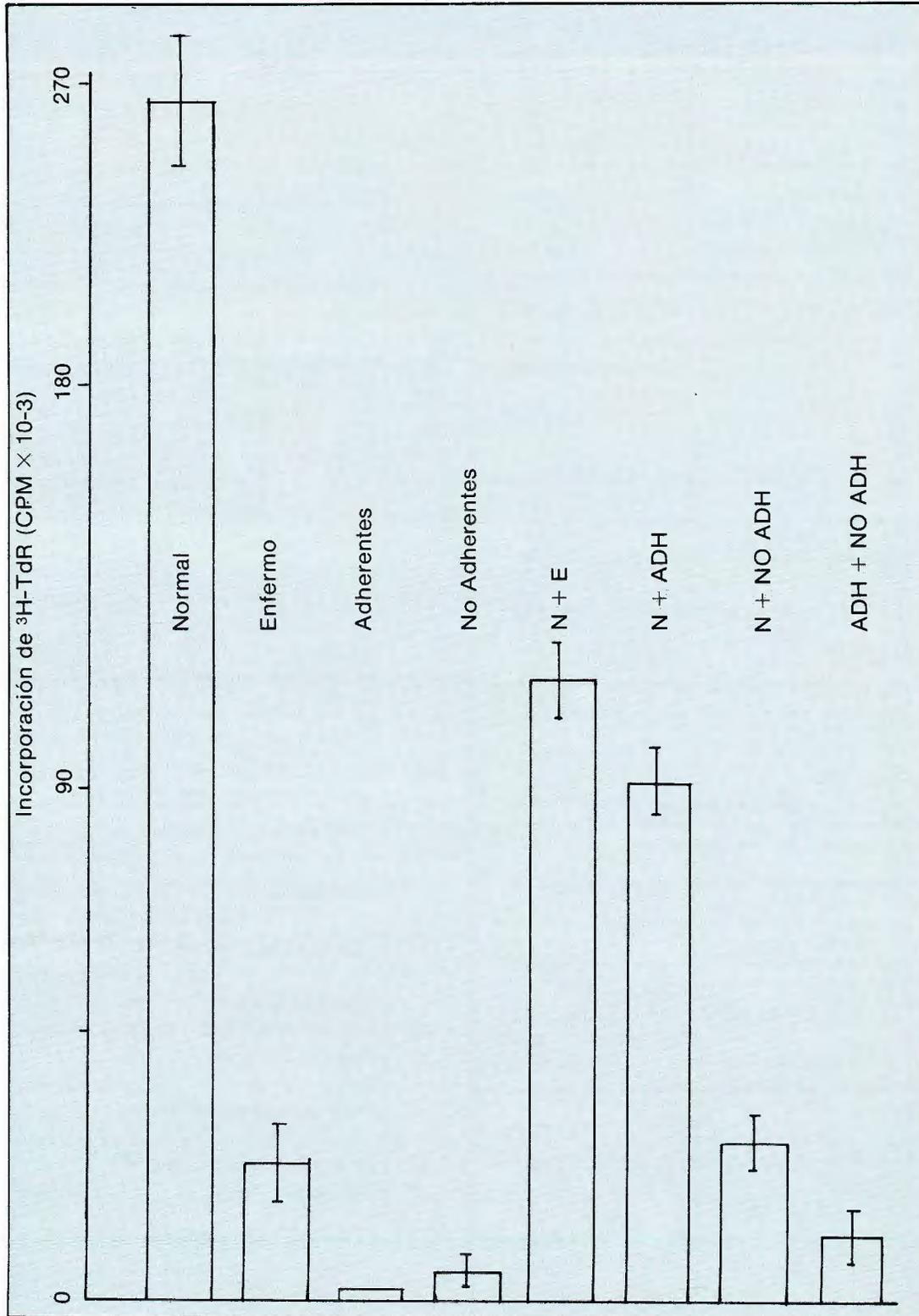
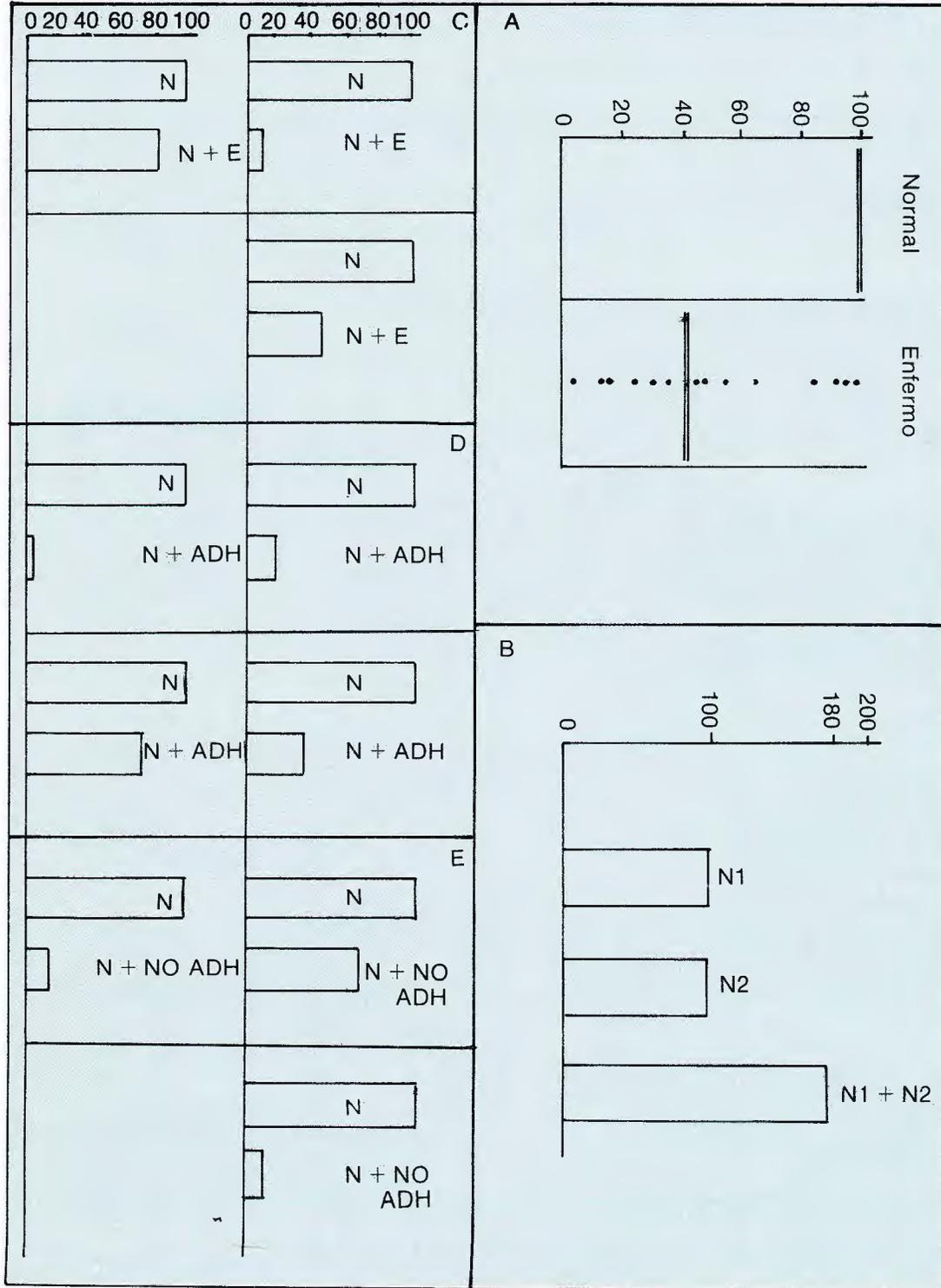


Fig. 5. Respuesta de linfocitos de pacientes tuberculosos y de sujetos sanos a la Con A (A); cocultivo de células de dos sujetos sanos donde se observa un efecto aditivo (B); efecto de las células mononucleares totales sobre la respuesta de células de individuos sanos a la Con A (C); cocultivo de células adherentes de pacientes tuberculosos y células linfoides de sujetos sanos (D) y efecto de células no adherentes de enfermos tuberculosos sobre la respuesta de células linfoides de sujetos sanos (E).



normal a la Con A cuando el paciente mejora. Es posible que este comportamiento sea debido a una disminución en el número de células supresoras adherentes o no adherentes. Son necesarios más estudios para definir qué factores intervienen en las funciones supresoras, ya sea de las células adherentes esterasa positivos (monocitos) o de las células no adherentes (linfocitos T supresores).

Algunos autores⁵ han encontrado que la eliminación de las células adherentes del cultivo restituye la respuesta al mitógeno. En nuestros estudios esto no siempre ocurrió y como mencionamos anteriormente, algunos pacientes presentaron ambas poblaciones celulares con propiedades supresoras. La posibilidad de que los monocitos puedan manejar fenómenos de supresión específica es remota, ya que aparentemente se requiere para que esto ocurra, de una célula supresora (T) que haga un reconocimiento específico de los antígenos de *M. tuberculosis*.¹² Actualmente se acepta que el macrófago por sí mismo no presenta esta capacidad de reactividad específica. Por tanto, las células supresoras en tuberculosis parecen actuar por medio de la interacción de la célula T supresora-macrófago-T efectora; esto explicaría por qué en algunos casos la eliminación de las células adherentes (macrófagos) mejora la respuesta de la célula T efectora a la Con A.⁵

Se ha informado que las micobacterias completas pueden estimular a las células adherentes a liberar factores solubles supresores tales como prostaglandinas.⁶ El alto contenido de lípidos en la pared de las micobacterias puede estar relacionado con la generación por parte de la célula mononuclear adherente, de estos factores supresores a través de la interacción con linfocitos T supresores. Otras moléculas del parásito como las arabinomanas, pueden también suprimir la respuesta blastogénica de los linfocitos humanos.⁶ Es necesario indicar que las micobacterias no ejercen ningún efecto supresor cuando se cultivan con una población carente de células adherentes.⁶ Es posible que el monocito jue-

gue un papel indispensable en la presentación de la micobacteria al linfocito T y que el faltar este monocito no se lleve a cabo el estímulo antigénico ni la respuesta mitogénica. Finalmente, es importante ubicar estos fenómenos *in vitro*, como hechos que pudieran reflejar lo sucedido en la enfermedad natural. En ésta, una alta concentración de micobacterias puede generar un mecanismo de evasión del parásito que le permita instalarse y favorecer la infección tuberculosa en el huésped. El estudio del funcionamiento de las células T en tuberculosis nos permite entender mejor la participación de la inmunidad mediada por células en la enfermedad y poder utilizarla en beneficio del paciente que la padece y que representa un problema de salud pública importante. □

Bibliografía

1. Pacheco, C.R., R. Olvera, M. Herrera. Panorama epidemiológico y control de la tuberculosis en la República Mexicana. XXII (3): 251. Salud Pública de México. 1980.
2. McKaness, G.B. The relationship of delayed hypersensitivity to acquired cellular resistance. Brit. Med. Bull. 25:52. 1967.
3. Gell, P.G.H., R.R.A. Coombs, P.J. Lachmann. Clin. aspects of Immunology. Third Edition Sec. IV Chapter 25. Blackwell Sci. Pub. Oxford. 1975.
4. Sell, S. Immunopathology. Am. J. of Pathology 90(1): 215. 1978.
5. Ellner, J.J. Suppressor adherent cells in human tuberculosis. J. of Immunol. 121(6): 2573. 1978.
6. Wade, A.A., R. Shes, A.R. Ralisan. Production of a suppressor factor by human adherent cells treated with Mycobacteria. J. of Immunol. 125(3): 1380. 1980.
7. Katz, P., R.A. Goldstein, A.S. Fanci. Immunoregulation in infection of suppressor monocytes and the alteration of subpopulation of T lymphocytes. J. of Infect. Dis. 140(1): 12. 1979.
8. Boyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. of Clin. Lab. Invest. 21: 77. 21 (Suppl. 97). 1968.
9. Pearse, A.G.E. Histochemistry Theoretical and Applied. London J. y A. Churchill Ltd. 1972.
10. Bloom, B.R., R. Glade. Conference *in vitro* methods in cell mediated immunity. N.Y. University Medical Center. *In vitro* Methods in Cell Mediated Immunity. New York Academic. 1971.
11. Moretta, L., M. Ferrarini, M.C. Mingari, A. Moretta, y S.R. Webb. Subpopulation of human T cells identified by receptors for immunoglobulins and mitogen responsiveness. J. Immunol. 17: 2171. 1976.
12. Stobo, J.D. Immunosuppression in man: suppression by macrophages can be mediated by interactions with regulatory T lymphocytes. J. Immunol. 119: 918. 1977.