

Linfocitos T de memoria durante la infección y enfermedad tuberculosa

J. Montes, F. Gambón-Deza*, M. Pacheco* y T. Cerdá**

Servicio de Medicina Interna. *Unidad de Inmunología. **Unidad de Investigación Clínico-Epidemiológica. Hospital Meixoeiro. Vigo.

OBJETIVOS: Examinar el papel de los linfocitos T vírgenes y de memoria (definidos por las isoformas CD45) en la infección tuberculosa reciente y en la enfermedad pulmonar y pleural. Correlacionar dichas subpoblaciones con las concentraciones séricas del receptor soluble de IL-2 (sIL-2R) e interleucina-6 (IL-6).

MÉTODOS: Las subpoblaciones linfocitarias T (CD3, CD4, CD8), vírgenes (CD45RA), memoria (CD45RO) y células T activadas CD25+ (receptor de IL-2), fueron medidas en sangre y pleura en pacientes con infección tuberculosa reciente (n = 7), tuberculosis pulmonar (n = 22) y pleuritis tuberculosa (n = 12). Se determinaron concentraciones séricas de sIL-2 e IL-6 en 13 pacientes con tuberculosis pleural o pulmonar y se correlacionaron con las subpoblaciones CD45RA y CD45RO.

RESULTADOS: Se observó una linfocitosis T afectando a todas las subpoblaciones estudiadas, incluyendo células T vírgenes y de memoria, aunque sin modificación del cociente RA:RO, con respecto a controles. Se observó una marcada acumulación de células T de memoria y de células T CD25+ en la pleuritis tuberculosa. No hubo correlaciones entre concentraciones de sIL-2 e IL-6 y subpoblaciones T vírgenes o memoria.

CONCLUSIONES: En la infección tuberculosa reciente se evidenció una linfocitosis T, afectando a células vírgenes y de memoria, aunque sin predominio de una sobre otra. En la pleuritis tuberculosa hay una compartimentalización de células T de memoria y células T activadas que presumiblemente representen un papel fundamental en la inmunidad local frente a *M. tuberculosis*.

Palabras clave: Inmunidad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Isoformas CD45. Memoria inmunológica. Subpoblaciones T.

(Arch Bronconeumol 1998; 34: 384-387)

Memory T cells during tuberculosis infection and disease

OBJECTIVE: To examine the role of naive and memory T cells (as determined by CD45 isoforms) in recent tuberculosis infection and in pulmonary and pleural forms of the disease. To relate such subpopulations to serum levels of soluble IL-2 receptor (sIL-2R) and interleukin-6 (IL-6).

METHODS: T cell subpopulations (CD3, CD4, CD8), naive (CD45RA), memory (CD45RO) and activated CD24+ T cells (IL-2 receptor) were measured in the peripheral blood and pleura of patients with recent tuberculosis infection (n = 7), pulmonary tuberculosis (n = 22) and tuberculosis pleurisy (n = 12). Serum levels of sIL-2 and IL-6 were determined in 13 patients with pleural or pulmonary tuberculosis and their relation to CD45RA and CD45RO subsets was analyzed.

RESULTS: T lymphocytosis involving all the subpopulations studied, including naive and memory T cells, was detected, although the RA:RO ratio did not change in relation to control levels. Marked increases in memory T cells and CD24+ T cells were found for patients with tuberculous pleurisy. sIL-2 and IL-6 levels were unrelated to naive and memory T cell subpopulations.

CONCLUSIONS: T lymphocytosis involving all T cell subsets can be observed in recent tuberculosis infection; both naive and memory T cells are implicated, although neither one predominates over the other. In tuberculous pleurisy there is compartmentalization of memory and activated T cells, which presumably play important roles in the local immune response to *Mycobacterium tuberculosis*.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis* immunity. CD45 analysis. Immunologic memory. T cell subsets.

Introducción

Aunque estudios previos han detallado las alteraciones de las subpoblaciones linfocitarias T durante la tu-

berculosis¹⁻⁴, son escasos los trabajos que hacen referencia a las células T de memoria en esta infección. En modelos animales se conoce que la memoria inmunológica frente a *Mycobacterium tuberculosis* es de larga duración⁵. Además la producción de interferón gamma (IF)^{6,7}, considerado uno de los principales causantes de la activación de los macrófagos contra *M. tuberculosis* se asocia a la aparición de células con fenotipo de memoria (CD45RB- en ratón)^{8,9}. La expresión de diferen-

Correspondencia: Dr. J. Montes Santiago.
Servicio Medicina Interna. Hospital Meixoeiro.
36200 Vigo. Pontevedra.

Estudio realizado con beca 93/0736 del Fondo de Investigaciones Sanitarias.

Recibido: 23-2-98; aceptado para su publicación: 28-4-98.

tes isoformas de CD45 –una glucoproteína de superficie con actividad tirosín-fosfatasa implicada en la activación de células T– ha sido utilizada para caracterizar estadios específicos de activación de linfocitos T. Así, los linfocitos CD4 producidos recientemente por el timo expresan la isoforma mayor (p 205/220) llamada CD45RA. Cuando estos linfocitos vírgenes encuentran un antígeno específico, se convierten en linfocitos de memoria que expresan una isoforma menor de CD45 (p 180) llamada CD45RO^{10,11}. No se conoce con certeza si este esquema puede aplicarse también a los linfocitos CD8¹². Se ha demostrado además que las células vírgenes CD4 (CD45RA) pueden ser activadas y proliferar mediante la combinación de la acción de diversas citocinas como IL-2, TNF e IL-6¹³.

El objetivo de este trabajo fue examinar la expresión de las isoformas CD45 durante la infección reciente por *M. tuberculosis* y durante la enfermedad pulmonar y pleural, estudiándose en el último caso también dicha respuesta celular en el líquido pleural. Se intentó correlacionar además las subpoblaciones vírgenes y de memoria con las concentraciones séricas de receptor soluble de IL-2 (sIL-2R) e IL-6, ya que se ha comunicado que estas dos citocinas demuestran una buena correlación con el grado de afectación tuberculosa¹⁴.

Material y métodos

Sujetos

Se incluyeron en este estudio 41 pacientes mayores de 10 años, atendidos en el Hospital Meixoeiro de Vigo. Se excluyeron pacientes con infección por VIH, con conductas en riesgo para adquirirla (usuarios de drogas por vía parenteral) y enfermos inmunodeprimidos (tratados con esteroides u otros inmunodepresores, portadores de neoplasia o de una infección concomitante; p. ej., hepatitis viral). A 7 pacientes, estudiados como contactos familiares de enfermos con tuberculosis pulmonar bacilífera, en los que se evidenció una conversión de la reacción de Mantoux en los 3 meses previos, se les incluyó en el grupo de infección reciente (MAN). Todos ellos pasaron de un Mantoux de < 5 mm a > 15 mm, y sus radiografías de tórax fueron normales. A 22 pacientes con radiografías compatibles con tuberculosis pulmonar y en los que se visualizaron bacilos ácido-alcohol resistentes en el esputo y/o presentaron un cultivo de Löwenstein positivo para *M. tuberculosis* se les incluyó en el grupo de tuberculosis pulmonar (PUL). En 12 pacientes se realizó un diagnóstico de pleuresía tuberculosa (PLE) por el hallazgo de granulomas caseificantes en la biopsia pleural o la

positividad del cultivo para *M. tuberculosis* en la biopsia o líquido pleural. Se utilizaron 10 controles sanos (CON) elegidos entre donantes de sangre o pacientes ambulatorios sanos. Todas las determinaciones en los enfermos se hicieron antes de transcurrir una semana de tratamiento antituberculoso. Se agrupó a 13 pacientes (cuatro con tuberculosis pleural y nueve con pulmonar) cuyas concentraciones séricas de sIL-2R e IL-6 pudieron correlacionarse con las subpoblaciones linfocitarias CD45RA y CD45RO.

Métodos

Se extrajo sangre venosa antes de las 10 a.m. y fueron separadas las células mononucleares mediante gradiente Ficoll-Hypaque (Lymphopred, Nyegaard, Oslo, Noruega). Las células mononucleares del líquido pleural se separaron también en Ficoll-Hypaque y una parte del líquido fue teñida con May-Grunwald-Giemsa y procesada para análisis bioquímico y recuento diferencial. Para calcular el número absoluto de cada subpoblación linfocitaria el porcentaje de células con tinción positiva en la citometría de flujo se multiplicó por el recuento absoluto de linfocitos en sangre periférica o pleura obtenido mediante contador Coulter. Se utilizaron anticuerpos monoclonales marcados con ficoeritrina o isotiocianato de fluoresceína. Se incubaron un total de 5 x 10⁵ células durante 30 min a 4 °C con los anticuerpos monoclonales y lavados dos veces con RPMI 1640 y 1% de FBS para eliminar los anticuerpos no ligados. El análisis citométrico se realizó con un citómetro ELITE (Coulter Electronics, Hialeah, Florida, EE.UU.). Se utilizó un promedio de 5.000 células para cada análisis. Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron CD3 (T3), CD4 (T4), CD8 (T8), CD25 (IL-2R1) (Coulter Immunology, Hialeah, Florida, EE.UU.) y CD45RA (Alb11), CD45RO (UCHL1) (Immunotech, Marsella, Francia). Las concentraciones séricas de sIL-2R se determinaron mediante sándwich ELISA (Eurogenetics, Tessenderlo, Bélgica). El límite de detección del test fue 20 U/ml. Las concentraciones de IL-6 se determinaron por sándwich ELISA (Quantikin[®], R&D Systems, Minneapolis, EE.UU.). El límite de detección fue 0,35 pg/ml.

Estudio estadístico

Los datos se expresan como media ± desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante SPSS 6.0 para Windows. Se utilizaron tests no paramétricos (Mann-Whitney y Kruskal-Wallis) para comparar la distribución de las subpoblaciones linfocitarias entre dos o más grupos. Todos los valores p son bilaterales y un valor < 0,05 se consideró significativo. El grado de asociación de los porcentajes y valores absolutos de las subpoblaciones CD45RA y CD45RO con las concentraciones séricas de sIL-2R e IL-6 se calculó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

TABLA I
Subpoblaciones linfocitarias (células/μl) en diversos estados tuberculosos

	CON (n = 10)	MAN (n = 7)	PLE (n = 12)	PUL (n = 22)
Linfocitos totales	1.380 ± 416	2.161 ± 654*	1.222 ± 373	1.571 ± 593
CD3	916 ± 350	1.531 ± 736*	854 ± 371	1.073 ± 472
CD4	682 ± 278	957 ± 551	518 ± 272	729 ± 323
CD8	326 ± 151	562 ± 258*	342 ± 182	399 ± 146
CD45RA (%)	929 ± 404 (66 ± 17)	1.257 ± 399 (58 ± 11)	668 ± 241 (55 ± 13)	968 ± 392 (62 ± 11)
CD45RO (%)	380 ± 162 (29 ± 16)	718 ± 676 (29 ± 18)	416 ± 272 (32 ± 15)	467 ± 186 (32 ± 12)
RA:RO cociente	2,78 ± 0,99	2,72 ± 1,42	2,07 ± 0,93	2,12 ± 0,73
Edad	50 ± 24	22 ± 8*	44 ± 22	41 ± 17

CON: controles sanos; MAN: infección reciente; PLE: pleuritis; PUL: pulmonar.
*p < 0,05 con respecto a controles.

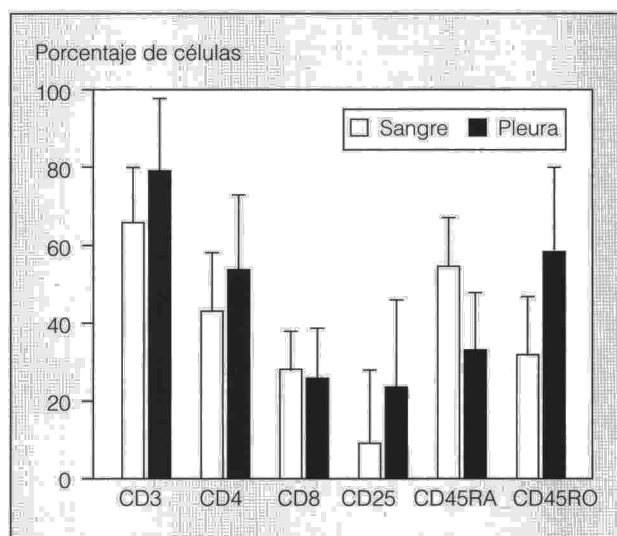


Fig. 1. Subpoblaciones linfocitarias T (%) en líquido pleural y sangre en pacientes con pleuritis tuberculosa.

Resultados

Los pacientes en el grupo MAN fueron significativamente más jóvenes que los pacientes del grupo CON (MAN: edad = 22 ± 8 , límites = 13-33; CON: edad = 50 ± 24 ; límites = 26-80; $p = 0,0059$). En la tabla I se muestra el número absoluto de linfocitos y subpoblaciones T en los grupos CON, MAN, PLE y PUL. Puede apreciarse la existencia de una linfocitosis en el grupo MAN que afecta a todas las subpoblaciones estudiadas. Sin embargo, no hubo diferencias en los porcentajes de CD45RA y CD45RO y del cociente RA:RO en el grupo MAN y PLE con respecto al grupo CON.

En la figura 1 se representan los porcentajes de subpoblaciones T en sangre y líquido pleural en 11 pacientes con tuberculosis pleural. Además de la acumulación preferencial de la subpoblación CD4, el hallazgo más importante es la inversión del cociente RA:RO en el líquido pleural con respecto al de sangre. (Cociente RA:RO; sangre: $2,10 \pm 0,87$; pleura: $0,66 \pm 0,38$.) En 7 de 11 pacientes se encontró una marcada expresión de CD25 (> 10% de las células). No hubo correlación entre porcentajes y valores totales de las subpoblaciones CD45RA y CD45RO y concentraciones séricas de sIL-2R e IL-6 en suero ($p > 0,1$) en todos los casos).

Discusión

Aunque en la infección tuberculosa reciente hubo un incremento en todas las subpoblaciones linfocitarias T, no se observó, sin embargo, un significativo predominio de la subpoblación CD45RA (virgen), a pesar de que los pacientes recientemente infectados eran significativamente más jóvenes que los controles (tabla I; fig. 1). En modelos murinos de inmunidad frente a *M. tuberculosis* el principal subtipo presente en la infección aguda corresponde a células vírgenes (CD45RB^{hi})¹⁵. Como demuestran nuestros datos esto parece diferente en humanos posiblemente en relación con la demostrada re-

ducción en la capacidad del timo para mantener las concentraciones de linfocitos T vírgenes (CD45RA) más allá de los 20 años¹⁶. Respecto a la tuberculosis pulmonar y pleural, originada en la mayor parte de casos por la reactivación de un proceso latente, sería esperable un predominio de células con fenotipo de memoria, observación que no se confirmó ya que el cociente RA:RO no se modificó con respecto a los controles. Esta falta de predominio del fenotipo de memoria contrasta con estudios in vitro que demuestran que las células humanas CD45RO, pero no las CD45RA, responden a antígenos de recuerdo purificados a partir de *M. tuberculosis*¹⁷. Estudios en ratones demuestran además una inmunidad de recuerdo frente a *M. tuberculosis*, altamente efectiva y residiendo también en la subpoblación CD45RB^{low} (fenotipo memoria)¹⁸. La falta de modificación del cociente RA:RO, tanto en la infección reciente como en la enfermedad pulmonar y pleural, admite varias interpretaciones. Una de ellas es la postulada —aunque controvertida— reversión de CD45RO a CD45RA^{19,20}. Otra es que los estímulos proliferativos antígeno-independientes no induzcan el cambio al fenotipo memoria CD45RO. Se ha demostrado, por ejemplo, que las células T vírgenes expandidas mediante combinación de citocinas siguen permaneciendo CD45RA²¹. No pudimos establecer, sin embargo, una correlación entre los fenotipos de memoria o vírgenes con las concentraciones séricas de sIL-2 o IL-6. Por último, es posible que estas observaciones estén en relación con la complejidad antigénica de *M. tuberculosis*²². En efecto, esta micobacteria desencadena una intrincada respuesta celular que afecta a múltiples estirpes celulares como fagocitos mononucleares, CD4, CD8, células T, células con perfil funcional Th-1 (secretoras de IL-2 e IF) y también Th-2 (secretoras de IL-4), que podrá variar con el estado de infección y que podrá ser la suma de las respuestas a múltiples antígenos y epítomos^{8,23-27}. Posiblemente la reciente clonación completa del genoma de *M. tuberculosis*²⁸ arroje más luz sobre el complejo tema de la inmunidad frente a este agente.

Otro dato destacable es la inversión del cociente RA:RO en el fluido pleural con respecto a la sangre periférica (fig. 1). Esto confirma nuestras observaciones y las de otros autores^{4,29} que comunican la compartimentalización de las células T de memoria en la pleuritis tuberculosa, quizá en relación con la actividad quimiotáctica del lipoarabinomano micobacteriano³⁰. Esto está también en concordancia con el hallazgo de que las células humanas CD45RO se adhieren al endotelio vascular y entran en los focos inflamatorios más fácilmente que las células CD45RA, debido a la expresión en su superficie de ciertas moléculas de adhesión (p. ej., VLA, LFA y otras)^{4,12,19} y que traducen una respuesta específica frente a ciertas citocinas (p. ej., SDF-1, 6-C-kine, MIP-3 α y MIP-3 β)³¹. Ya que las células con fenotipo de memoria (CD45RO o CDw29) producen importantes cantidades de IFN γ , su compartimentalización tendría un papel sustancial en la inmunidad local mediada por células frente a *M. tuberculosis*³². La mayor parte de los líquidos estudiados (7 de 11) evidenciaron concentraciones elevadas de expresión del marcador

temprano de activación CD25 (receptor de IL-2), lo que sugiere que estas células se activaron tras su contacto con el antígeno. La falta de expresión de CD25 en el resto de líquidos podría ser explicada admitiendo que esta activación celular pudiera ocurrir de forma intermitente (aparición y desaparición de CD25).

En resumen, nuestros datos sugieren que en la infección tuberculosa reciente, y también en la enfermedad pulmonar y pleural, la respuesta celular T involucra tanto a células vírgenes como de memoria. Estas últimas se activan, se acumulan de forma preferencial en la pleuritis tuberculosa y presumiblemente desempeñan un papel esencial en la inmunidad local frente a este agente.

Agradecimientos

Agradecemos a Isabel Vicente su asistencia técnica.

BIBLIOGRAFÍA

- Albera C, Mabritto I, Ghio P, Scaglioni GV, Pozzi E. Lymphocyte subpopulations analysis in pleural fluid and peripheral blood in patients with lymphocytic pleural effusions. *Respiration* 1991; 58: 65-71.
- Ainslie GM, Solomon JA, Bateman ED. Lymphocyte and lymphocyte subset numbers in blood and in bronchoalveolar lavage and pleural fluid in various forms of human pulmonary tuberculosis at presentation and during recovery. *Thorax* 1992; 47: 513-518.
- Oazaki T, Nakahira S, Tanim K, Ogushi F, Yasuoka S, Ogura T. Differential cell analysis in bronchoalveolar lavage fluid from pulmonary lesions of patients with tuberculosis. *Chest* 1992; 102: 54-59.
- Barnes PF, Mistry SD, Cooper CL, Pirmez C, Rea TH, Modlin RL. Compartmentalization of a CD4+ T lymphocyte subpopulation in tuberculous pleuritis. *J Immunol* 1989; 142: 1.114-1.119.
- Orme IM. Characteristics and specificity of acquired immunologic memory to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 1988; 140: 3.589-3.593.
- Dunlap NE, Briles DE. Immunology of tuberculosis. *Med Clin N Am* 1993; 77: 1.235-1.251.
- Lipscomb MF, Rice DE, Lyons R, Schnyler MR, Wilkes D. The regulation of pulmonary immunity. *Adv Immunol* 1995; 59: 369-455.
- Orme IM, Andersen P, Boom H. T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1993; 167: 1.481-1.497.
- Andersen P, Heron I. Specificity of a protective memory immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1993; 61: 844-851.
- Gray D. Immunological memory. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 49-77.
- Weinberg K, Parkman R. Age, the thymus, and T lymphocytes. *N Engl J Med* 1995; 332: 182-183.
- Lockley RM, Wilson CB. Cell-mediated immunity and its role in host defense. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editores. *Principles and practice of infectious disease*. (4.ª ed.). Nueva York: Churchill Livingstone, 1995; 102-149.
- Abrignani S. Bystander activation by cytokines of intrahepatic T cells in chronic viral hepatitis. *Sem Liver Dis* 1997; 17: 319-322.
- Chan CHS, Lai K-N, Leung JCK, Lai CKW. Lymphocyte activation in patients with active tuberculosis. *Am Rev Resp Dis* 1991; 144: 458-460.
- Griffin JP, Orme IM. Evolution of CD4 T-cell subsets following infection of naive and memory immune mice with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1994; 62: 1.683-1.690.
- Mckall CL, Fleisher TA, Brown MR et al. Age, thymopoiesis, and CD4 + T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med* 1995; 332: 143-149.
- Plebanski M, Saunders M, Burtles SS, Crowe S, Hooper DC. Primary and secondary human in vitro T-cell responses to soluble antigens are mediated by subsets bearing different CD45 isoforms. *Immunology* 1992; 75: 86-91.
- Andersen P, Andersen AB, Sorensen AL, Nagai S. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *J Immunol* 1995; 154: 3.359-3.372.
- Mackay CR. Immunological memory. *Adv Immunol* 1993; 53: 217-265.
- Michie CA, McLean AR. Regeneration of T cells after chemotherapy. *N Engl J Med* 1995; 332: 1.651.
- Unumatz D, Pileri P, Abrignani S. Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination. *J Exp Med* 1994; 180: 1.159-1.164.
- Daugelat S, Gulle H, Schoel B, Kaufmann SHE. Secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: characterization with T lymphocytes from patients and contacts after two-dimensional separation. *J Infect Dis* 1992; 166: 186-190.
- Orme IM, Roberts AD, Griffin JP, Abrams JS. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1993; 151: 518-525.
- Kaufmann SHE. Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 129-163.
- Zhang M, Liu Y, Iyer DV, Gong J, Abrams JS, Barnes PF. T-cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995; 63: 3.231-3.234.
- Mehra V, Gong JH, Iyer D, Lin Y, Boyle CT, Bloom BR et al. Immune response to recombinant mycobacterial proteins in patients with tuberculosis infection and disease. *J Infect Dis* 1996; 174: 431-434.
- Hopewell PL. Tuberculosis in persons with human immunodeficiency virus infection. En: Sande MA, Volberding PA, editores (5.ª ed.). Filadelfia: Saunders, 1997; 311-325.
- Williams N. Genome of Tb culprit deciphered. *Science* 1998; 279: 25.
- Gambón-Deza F, Pacheco Carracedo M, Cerdá Mota T, Montes Santiago J. Lymphocyte populations during tuberculosis infection: V repertoires. *Infect Immun* 1995; 63: 1.235-1.240.
- Berman JS, Blumenthal RL, Kornfeld H, Cook JA, Cruishank WW, Vermeulen MW et al. Chemotactic activity of mycobacterial lipoarabinomannans for human blood T lymphocytes in vitro. *J Immunol* 1996; 156: 3.828-3.835.
- Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 1998; 279: 381-384.
- Valdés L, San José E, Álvarez D, Sarandeses A, Pose A, Chomón B et al. Diagnosis of tuberculosis pleurisy using the biological parameters adenosine deaminase, lysozyme and interferon-gamma. *Chest* 1993; 103: 458-46.