



Evaluación del factor de necrosis tumoral en tuberculosis

Julia Cristina Calzada, Juan Carlos Sepúlveda, Liliana Valderrama,
Carlos Alberto Victoria, David McMurray

El factor de necrosis tumoral (TNF) es una citoquina que juega un papel muy importante en la patogénesis de la tuberculosis. Como un producto de monocitos-macrófagos y de linfocitos, puede ejercer efectos benéficos y perjudiciales como resultado de la infección con *M. tuberculosis*. En este estudio se implementaron y optimizaron las condiciones de un bioensayo con células L-929 para cuantificar TNF en un grupo de 14 pacientes tuberculosos y 15 controles sanos. Todos los pacientes fueron diagnosticados por baciloscopia y las muestras obtenidas antes de iniciar el tratamiento. En ambos grupos se realizó la prueba de tuberculina por el método de Mantoux, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica para efectuar ensayos de

linfoproliferación y purificación de células adherentes. En los sobrenadantes obtenidos de los cultivos celulares se determinaron los niveles de TNF. Los experimentos dosis-respuesta al PPD indicaron que 10 ug/ml era la dosis óptima a usar. Al comparar la liberación de TNF por células adherentes (monocitos) y células mononucleares completas (monocitos y linfocitos) encontramos que ambas poblaciones celulares producen TNF espontáneamente y en respuesta al PPD, con mayor liberación por parte de los monocitos. Con respecto a la producción de TNF y la respuesta proliferativa al PPD, se encontró correlación estadísticamente significativa entre estas dos variables ($p=0.001$). Nuestros hallazgos concuerdan con el modelo de respuesta Th1, en el cual se libera INF- γ como respuesta inicial a la infección por la micobacteria, induciendo la posterior liberación de TNF con el propósito de controlar la infección.

Introducción

La tuberculosis es una infección crónica, producida por las especies de micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* (*M. bovis*, *M. africanum*, *M. tuberculosis*) (1). La mayoría de las veces la bacteria ingresa al organismo por la vía aérea para multiplicarse inicialmente en el interior de los macrófagos alveolares (2). La entidad se caracteriza por gran destrucción tisular, que aunque puede afectar cualquier órgano, lesiona principalmente los pulmones, produciendo granulomas con un centro de necrosis (3). Si bien la transmisión de la infección tuberculosa es función directa del número de fuentes de infección, modificada por las condiciones medioambientales, la morbilidad depende del estado inmune y de los factores genéticos del infectado (4). Por ello,

Dra. Julia Cristina Calzada: Médico. Departamento de Microbiología. Facultad de Salud, Universidad del Valle. Estudiante de Doctorado. Institut Fur Immuologie, Universitat Munchen. Alemania; Dr. Juan Carlos Sepúlveda, Médico, Corporación Cideim; Dra. Liliana Valderrama B.: Bióloga. Corporación Cideim; Dr. Carlos Alberto Victoria, Médico-internista, Coordinador Programa de Vías Respiratorias, Secretaría de Salud Pública Municipal. Cali, Profesor Auxiliar, Facultad de Salud, Universidad del Valle; Dr. David Neil McMurray, Inmunólogo, Department of Medical Microbiology and Immunology, Texas A & M University Health Science Center, College Station, Texas, 77843. U.S.A. Investigador Asociado Corporación Cideim.

además de las actividades operativas para el control de la enfermedad, la respuesta inmune en tuberculosis es materia de amplio estudio.

Uno de los mecanismos fundamentales en la respuesta del huésped contra la micobacteria es la inhibición del crecimiento bacteriano en el interior de los macrófagos tisulares, esto depende a la vez de un proceso de retroalimentación mediado por citoquinas producidas por macrófagos y linfocitos T en respuesta a la estimulación antigénica (5). Una de las citoquinas más relevantes en la respuesta inmune a la tuberculosis es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y su producción puede asociarse con una respuesta protectora por parte del huésped o con la patología de la enfermedad. Las acciones protectoras comprenden básicamente la muerte de la micobacteria dentro de los macrófagos estimulados por TNF α y la inhibición del crecimiento bacteriano, el cual puede ser estimulado por otras citoquinas (6, 7). La producción *in vivo* de TNF α , es la responsable de la formación del granuloma, limitando la diseminación de la bacteria en el huésped (8). De otro lado, el TNF α se encuentra asociado con la patología produciendo necrosis tisular (9) y manifestaciones clínicas como fiebre, pérdida de peso y efusión pleural (10).

La identificación del papel que cumplen las citoquinas en procesos biológicos y entidades clínicas ha sido facilitado por el desarrollo de bioensayos con clones de líneas celulares sensibles a los efectos de las citoquinas, que permiten demostrar cada actividad (11). La activi-

dad del TNF se cuantifica empleando líneas celulares continuas, sensibles a la acción del TNF, tales como las células L-929 y células WEHI (11).

El objetivo de este trabajo fue determinar los niveles del TNF liberados *in vitro* por células mononucleares periféricas (CMNP) de pacientes con tuberculosis activa y compararlos con los niveles producidos por las células de los individuos sanos. Pretendemos determinar además la contribución de los monocitos y de las CMNP en la liberación del TNF.

La relación entre la respuesta celular al PPD y la producción de TNF también fue examinada.

Material y métodos

Sujetos estudiados. El estudio incluyó 15 adultos sanos como controles, apareados por edad y sexo con los pacientes, voluntarios de la Facultad de Medicina de la Universidad del Valle y personal de la Fundación Cideim. Se estudiaron 14 pacientes adultos (de 15 a 60 años) provenientes de los centros de salud y del Hospital Mario Correa de la ciudad de Cali, con diagnóstico de tuberculosis pulmonar comprobada bacteriológicamente. Las muestras de esputo fueron examinadas microscópicamente mediante tinción de Ziehl Neelsen en el laboratorio de bacteriología del Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle. La muestra de sangre para el estudio fue obtenida antes del inicio del tratamiento antituberculoso. Se emplearon muestras de sangre obtenidas de pacientes en las cuales la prueba de Elisa y para HIV fue negativa. Tanto los controles como los pacientes recibieron información

previa sobre los procedimientos médicos por realizar y firmaron voluntariamente un formato de consentimiento antes de la toma de las muestras, conforme a los reglamentos nacionales e internacionales sobre protección de sujetos participantes en investigaciones biomédicas.

Prueba de tuberculina. A cada uno de los individuos se le realizó la prueba de tuberculina por el método de Mantoux, el cual consiste en inyectar 0.1 ml de 5TU PPD RT-23 (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) en la cara anterior del antebrazo izquierdo. Las reacciones fueron leídas a las 72 horas, midiendo la induración en milímetros. El resultado anotado fue el promedio de los dos diámetros medidos. Se consideró positiva una reacción cuando el diámetro fue igual o mayor de 10 mm.

Obtención de células mononucleares. A cada uno de los sujetos experimentales se le tomó una muestra de 20 a 30 ml de sangre venosa, en tubo heparinizado. Los mononucleares se separaron por centrifugación sobre Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo). La capa de mononucleares obtenida se lavó dos veces y se resuspendieron en RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY) suplementando con 0.25 mM hepes (Sigma), 0.24 mM bicarbonato de sodio (Sigma), 200 mM L-glutamina (Gibco BRL, Grand Island, NY), penicilina 100 U/ml - estreptomina 100 ug/ml (Gibco BRL) y 10% de un *pool* de suero humano consistente en una mezcla en partes iguales de sueros obtenidos de

adultos del sexo masculino, tuberculino negativos, inactivado a 56°C durante 30 minutos. Se contaron las células vivas empleando eosina Y al 0.1% y se ajustó la concentración de las mismas a 1×10^6 células/ml. Para evitar la estimulación inespecífica por contaminación con lipopolisacárido (LPS), se empleó material estéril, desechable y medios reactivos libres de pirógeno y polimixina B (Sigma) a una concentración de 25 ug/ml.

Linfoproliferación. Las células mononucleares periféricas se cultivaron por triplicado en microplacas de 96 pozos (Falcon, Becton Dickinson Labware) a una concentración de 1×10^5 células/pozo y se estimularon con 10 ug/ml de PPD (Batch RT47, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) durante siete días a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Ocho horas antes de la cosecha fueron pulsadas con $1 \mu\text{Ci}$ /pozo de ³H-timidina (Amersham, UK). Se cosecharon en papel de fibra de vidrio (Whatman, Maidstone, England) y la incorporación de timidina fue medida empleando un contador de centelleo (Beckman LS 7000). Al promedio en cuentas por minuto (cpm) se les restó las cpm del control (células sin estímulo) para obtener el cpm neto. Se consideraron como respuestas proliferativas positivas las de los cultivos estimulados que presentaron un cpm neto mayor que el promedio de los cpm en los cultivos no estimulados y como respuestas negativas, las de los cultivos estimulados que presentaron un cpm neto menor que el promedio de los cpm de los cultivos no estimulados.

Purificación de células adherentes. Una vez obtenidos los mononucleares como se describió anteriormente, se ajustó la concentración de células a 1×10^6 células/ml en RPMI-1640 suplementario con 10% de pool de suero humano. Se depositó 1 ml de la suspensión celular en microplacas de 24 pozos (Falcon, Becton Dickinson Labware) que contenían laminillas en cada uno de los pozos y se incubó a 37°C, 5% CO₂. Dos horas más tarde se eliminaron las células no adherentes, se incubó durante 18 y 72 horas al término de las cuales se recolectó el sobrenadante, se extrajo la laminilla y se coloreó con tinción de estearasas inespecíficas (Sigma) para determinar el porcentaje de pureza de los monocitos obtenidos. Los monocitos purificados y los mononucleares se cultivaron en paralelo, bajo las mismas condiciones, en microplacas de 96 pozos a una concentración de 1×10^5 células/pozo. Los cultivos se realizaron por triplicado y se estimularon con PPD. Las células fueron incubadas a 37°C, 5% CO₂. Se recolectó en un vial el contenido de los tres pozos que constituían cada cultivo; mediante centrifugación a 200 g durante tres minutos se obtuvo el sobrenadante y se conservó a -70°C hasta su uso.

Bioensayo para TNF con la línea celular L-929. Las células L-929 (ATCC CCL1; American Type Culture Collection, Rockville, MD) son una línea tumoral de fibroblastos murinos sensible a la acción citotóxica del TNF. Se emplearon las células L-929 tratadas con actinomicina D (Sigma) para incrementar la sensibilidad a la acción del TNF (12). Brevemente, las células L-

929 se cultivaron en microplacas de 96 pozos a una concentración de 6×10^4 células por pozo en 100 ul de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado. Se incubaron durante 12 horas a 37°C con 5% de CO₂, se reemplazó el medio y se agregaron 50 UI de actinomicina D a una concentración de 4 ug/ml y 50 UI de las muestras a probar por triplicado o una dilución de TNF- α recombinante (r-TNF- α). Después de 24 horas de incubación, las células se fijaron con metanol y se tiñeron con cristal violeta al 1% (Sigma), se lavó la placa con agua corriente y se adicionaron 50 ul de SDS al 10% con el fin de solubilizar el colorante. Las diferencias de color se cuantificaron en un lector de Elisa a 570nm (Dynatech MR 500). La viabilidad celular es inversamente proporcional a la concentración de TNF y a la densidad óptica (DO).

Dosis-respuesta al PPD. Se estudiaron mononucleares de cuatro individuos sanos tuberculino positivos, cultivadas durante 18 horas en microplacas de 96 pozos y se evaluó la liberación de TNF en respuesta a la estimulación con PPD en las siguientes concentraciones: 0.1, 10, 100 mg/ml. Como control se empleó medio de cultivo solo. De esta forma se determinó la dosis de PPD por emplear en los ensayos.

Métodos de análisis estadístico. Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, para observar la distribución de los datos y utilizar pruebas paramétricas cuando la distribución era normal y pruebas no paramétricas, si no cumplía con los criterios de normali-

dad. Para determinar la variabilidad se obtuvieron los datos de media aritmética, desviación estándar y coeficientes de variación. En los experimentos dosis-respuesta, se realizaron análisis de regresión lineal entre las variables densidad óptica y concentración de TNF. Se compararon los resultados de los cultivos no estimulados (control) con los resultados de los estimulados, mediante pruebas T, con un nivel de significancia de 5%. Se identificaron las diferencias entre las pruebas de tuberculina y la respuesta linfoproliferativa (RLP) aplicando la prueba de McNemar que fue corregida con la prueba de Fisher debido a que algunas de las frecuencias fueron menores de cinco.

Se evaluaron las diferencias entre los casos y controles mediante pruebas no paramétricas Mann-Whitney con un nivel de significancia de 5%. Se realizaron análisis de correlación para determinar la relación entre los datos de la linfoproliferación informados en cpm neto y los datos de liberación de TNF informados en densidad óptica neta.

Resultados

Curva patrón con TNF- α recombinante humano

En cada experimento se realizó una curva patrón con TNF- α , la cual se inició con una concentración de 3000 pg/ml de TNF- α y se continuó con diluciones seriadas 1:2 hasta llegar a una concentración de 0.39 pg/ml. Como control negativo se utilizaron células con medio completo.

La Figura 1 ilustra la curva patrón en la cual puede apreciarse el alto nivel de correlación estadística entre DO y la concentración de TNF recombinante. La

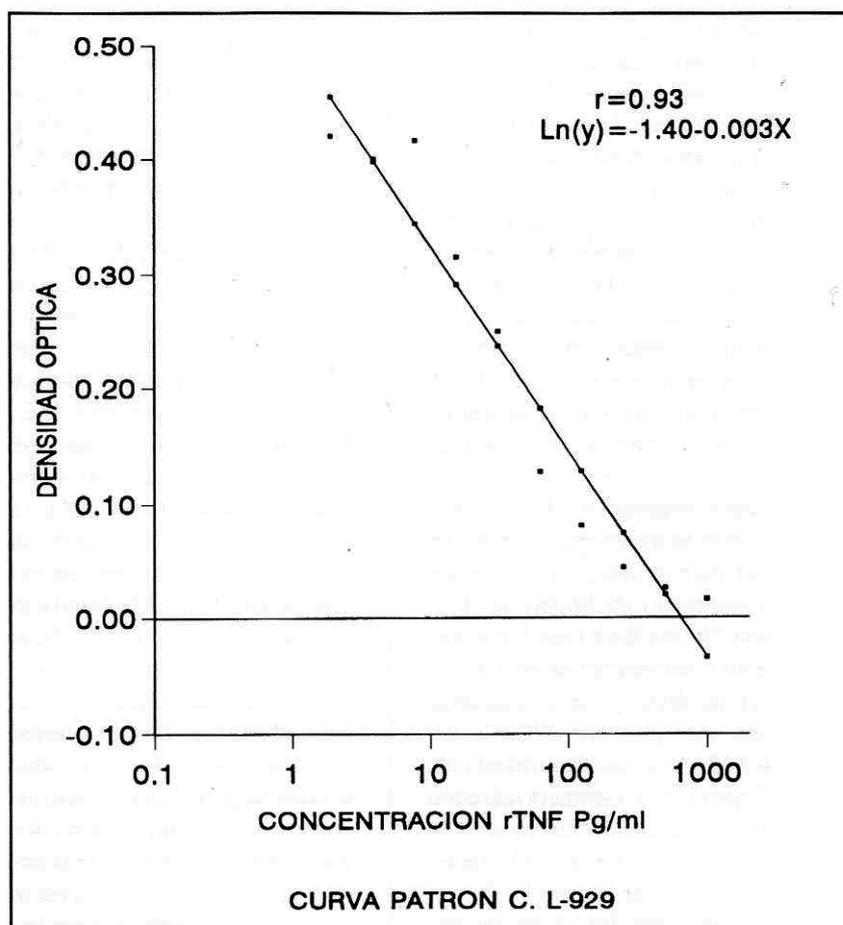


Figura 1. Curva-patrón con *r-TNF α* y células L-929. Existe una relación inversamente proporcional entre la densidad óptica y la concentración de TNF.

estos resultados que 10 ug/ml de PPD era la dosis óptima para usar en posteriores experimentos.

Variación intra e inter-experimento

La Tabla 1 ilustra la variabilidad inter e intra ensayo observada con el bioensayo. Para la variabilidad intra experimento, el punto de menor variabilidad correspondió a la concentración de 125 pg/ml de TNF α en donde se observó un coeficiente de variación de 10%. La zona de mayor variabilidad se presentó en las concentraciones de 250 a 1000 pg/ml con un coeficiente de variación en el rango de 13 a 22%.

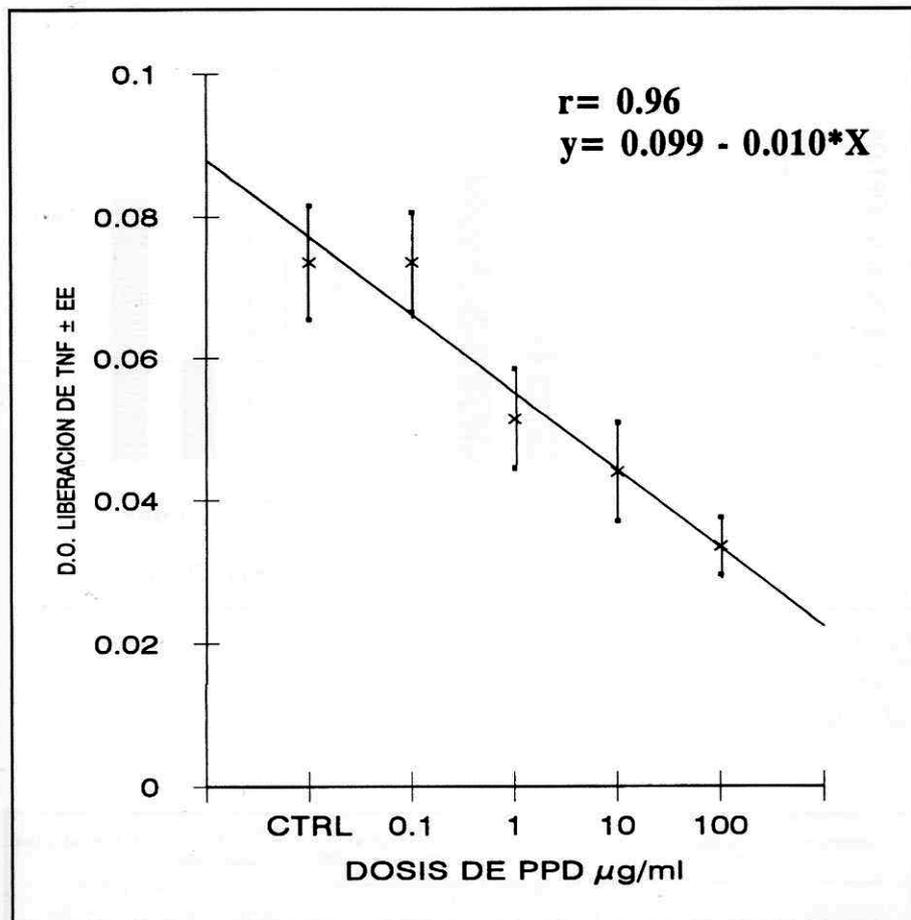


Figura 2. Experimento de dosis respuesta con células mononucleares obtenidas de cuatro individuos sanos sensibilizados, estimuladas con PPD durante 18 horas. Los resultados están graficados como el promedio ± el error estándar de los datos en densidades ópticas.

Por lo que respecta a la variación entre experimentos, el coeficiente de variación se encuentra en el rango entre 29 y 50% tanto en altas como en bajas concentraciones.

Comparación entre células adherentes (monocitos) y células mononucleares (monocitos y linfocitos o CMNP)

La Figura 3 muestra que existe una diferencia significativa en la liberación espontánea de TNF entre los monocitos purificados y las CMMNP, tanto a las 18 horas ($p < 0.025$) como a las 72 horas ($p < 0.002$). En esta figura, los datos están representados como 1 - DO, es decir, un valor alto de densidad óptica (DO) indica un nivel alto de TNF- α . Cuando los cultivos fueron estimulados con PPD, no se observó diferencia con significancia estadística.

Estos resultados indican que las dos poblaciones celulares producen TNF espontáneamente y en respuesta a PPD, observándose mayor liberación de TNF por parte de los monocitos, sin encontrar diferencia cuantitativa en los monocitos evaluados tanto a las 18 como a las 72 horas.

Producción de TNF y respuesta proliferativa al PPD

Una serie de pacientes con diagnóstico confirmado de tuberculosis pulmonar ($n=14$) y donantes sanos con respuesta cutánea positiva al PPD ($n=17$), se clasificaron de acuerdo con su respuesta linfoproliferativa al mismo.

Como se observa en la Tabla 2, las células de cinco de los 14 pacientes estudiados no proliferaron cuando se cultivaron *in vitro* con PPD, sugiriendo anergia. Las células de los pacientes que fueron PPD reactivos *in vitro*

Variación entre experimento							
Concentración r-TNF α en pg/ml	1000	500	250	125	62.5	31.2	15.6
Promedio	0.068	0.087	0.122	0.152	0.217	0.317	0.339
CV%*	36.1	29.1	31.7	49.10	34.8	32.6	48.8
Variación intra experimento							
Concentración r-TNF α en pg/ml	1000	500	250	125	62.5	31.2	15.6
Promedio	0.021	0.038	0.056	0.090	0.138	0.235	0.283
CV19.3*	19.3	21.0	13.6	9.9	11.6	12.6	12.2

* Coeficiente de variación (en porcentaje)

Tabla 1. Variación entre e intraexperimento dado por las células L-929

(n=9) produjeron más TNF espontáneamente (0.851 ± 0.036) que las células de los pacientes sin respuesta proliferativa al PPD (0.723 ± 0.035). Esta diferencia no fue observada entre los dos grupos mencionados luego de la estimulación con PPD. Entre los pacientes hubo una correlación estadísticamente significativa entre el grado de linfoproliferación y producción de TNF ($p = 0.001$). Entre los sujetos control sano, también se observó mayor producción de TNF en los sobrenadantes de cultivos que presentaron proliferación en respuesta al PPD. Sin embargo, cuando se agruparon los datos de los sujetos sanos, no hubo correlación significativa entre linfoproliferación y producción de TNF ($p = 0.22$).

La Tabla 3 muestra la relación entre la prueba cutánea al PPD y la respuesta proliferativa al mismo en el grupo de pacientes tuberculosos y en el de controles. En ambos grupos se observó concordancia entre la respuesta cutánea positiva y la proliferación, encontrándose disociación en algunos de los individuos que fueron negativos a la prueba cutánea y respondieron en la proliferación, lo cual se observó principalmente en el grupo de los controles. La relación entre estas dos medidas de la respuesta inmune al PPD no llegó al nivel de significancia estadística en los pacientes ni en los controles.

Discusión

En el presente estudio se evidenció la liberación *in vitro* de TNF α a partir de cultivos de células mononucleares de pacientes tuberculosos e individuos sanos en respuesta a antígenos específicos de la micobacteria. Actual-

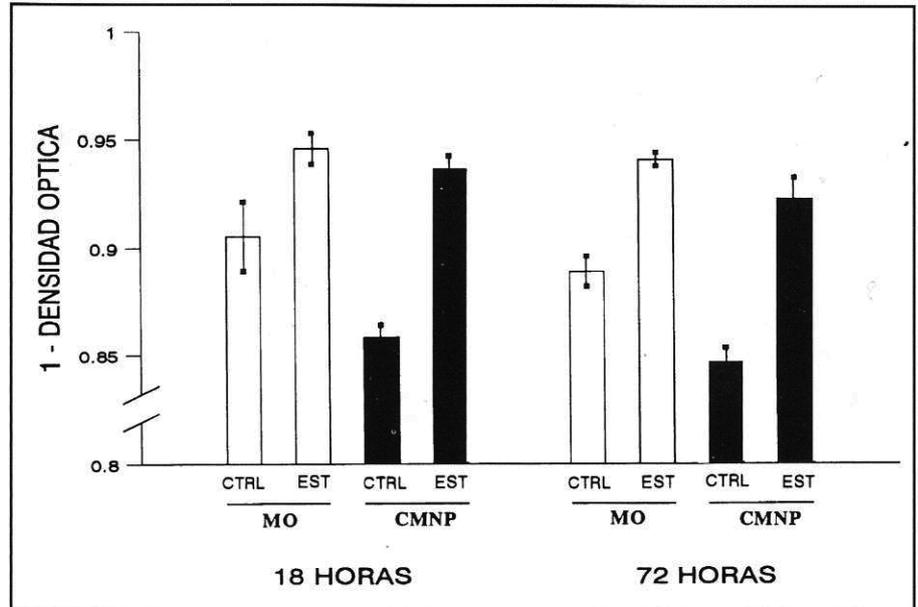


Figura 3. Liberación de TNF por células adherentes (mono-citos, MO, pureza > 90%) y CMNP (linfocitos y monocitos) obtenidos de siete individuos sanos sensibilizados, cultivados durante 18-72 horas. Las células se cultivaron con (EST) o sin (CTRL) el estímulo de 10 µg/ml de PPD. Los resultados están graficados como 1 - DO ± el error estándar.

Grupo	Respuesta proliferativa *	N	1-D.O Control ±EE	1-DO+ Estímulo ±EE	1-D.O+ Neto ±EE	Correlación
Pacientes	-	5	0.723 ± 0.035	0.755 ± 0.057	0.968 ± 0.042	r= -0.82
	+	9		0.851 ± 0.036	0.865 ± 0.033	0.986 ± 0.007
	-	3	0.802 ± 0.059	0.789 ± 0.087	0.00	r = 0.038
	+	12	0.856 ± 0.022	0.904 ± 0.021	0.952 ± 0.010	p = 0.122

* Respuesta proliferativa a 10µ/ml de PPD
 + Estímulo 10µg/ml PPD
 + Cálculo neto: DO control - DO estímulo (Liberación de TNF > 0)
 Correlación entre la respuesta proliferativa y la liberación de TNF

Tabla 2. Liberación de TNF por CMNP obtenidas de pacientes tuberculosos e individuos sanos clasificados según respuesta linfoproliferativa al PPD.

Linfoproliferación			
Pacientes	Positiva	Negativa	P*
PPD positivo	7	2	0.45
PPD negativo	3	2	
Controles			
PPD positivo	7	0	0.12
PPD negativo	5	3	
* Prueba exacta de Fisher			

Tabla 3. Relación entre la prueba cutánea y la respuesta linfoproliferativa al PPD en grupos de pacientes tuberculosos y controles sanos.

mente existen diferentes estrategias metodológicas como el inmunoensayo y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para cuantificar la producción de TNF y otras citoquinas. El bioensayo es una técnica sensible y relevante a nivel biológico ya que determina sólo la proteína activa. No obstante, hay dificultades en especificidad debido a la no distinción entre TNF α y TNF β (12-15). Igualmente, la alta variabilidad intra e inter experimento que otros autores y nosotros observamos. (14), son limitantes de esta metodología. A pesar de lo anterior, nuestros resultados son concordantes con lo informado en la literatura.

Estas metodologías alternas se caracterizan por ser más específicas y menos variables que los bioensayos. A pesar de que estas dos técnicas no determinan citoquinas biológicamente activas, tienen una gran ventaja debido a que son menos sensibles a los efectos inhibitorios de taponos u otras sustancias presentes en muestras biológicas (16). Los ensayos de dosis respuesta (Figura 2) mostraron que las células mononucleares periféricas respondieron de una manera dependiente de la dosis de PPD empleado. Esto permite atribuir el incremento en la producción de TNF al estímulo antigénico por PPD, discriminando así entre la producción espontánea y la inducida por el antígeno.

Es bien conocido que el TNF α es liberado por las células de la línea de monocitos o macrófagos en respuesta al LPS (17) y a una gran variedad de agentes infecciosos como bacterias Gram negativas (18, 19), Gram positivas (20), virus (21), parásitos (22, 23) y hongos (24). En este estu-

dio hemos encontrado que los monocitos y células mononucleares periféricas producen TNF en respuesta al estímulo con PPD, pero también se encuentra liberación de TNF en células no estimuladas. Lo anterior indica que las dos líneas celulares (monocitos - macrófagos y linfocitos) liberan TNF tanto en forma espontánea como estimulada, encontrándose mayor liberación de TNF por parte de los monocitos, sin encontrar diferencia cuantitativa en la cinética de liberación de TNF para estas dos poblaciones celulares. Estos resultados demuestran que las células de los pacientes con tuberculosis podrían ser activadas *in vivo* por antígenos micobacterianos.

Es de anotar que tanto a las 18 como a las 72 horas, los monocitos liberaron más TNF que las células mononucleares completas. Sin embargo, hay mayor diferencia entre los niveles de TNF liberados por los mononucleares completos sin estímulo y los estimulados con PPD. Esto indica que la respuesta de las células mononucleares completas a PPD es más específica que la de los monocitos y que la liberación de TNF está relacionada con la interacción específica entre el antígeno (PPD) y el receptor CD3 asociado a las células T (25). Además, encontramos que los monocitos obtenidos de los pacientes tuberculosos, liberan más TNF que los de los controles, tanto en forma espontánea como estimulada, lo cual concuerda con lo informado por Takashima y cols. (26), quienes fueron los primeros en demostrar diferencias en la liberación de TNF por parte de monocitos de pacientes tuberculosos,

correlacionados con el estado de la enfermedad. Estos investigadores encontraron niveles elevados de TNF en pacientes tuberculino positivos con tuberculosis activa recién diagnosticada y bajos niveles en los pacientes tuberculino positivos con tuberculosis refractaria crónica. Estos resultados se complementan con los de Ogawa y cols (27), quienes mostraron que los monocitos provenientes de sangre periférica de pacientes tuberculosos producen más TNF que los controles.

Como se mencionó anteriormente, se observó una disociación entre la respuesta cutánea negativa y la linfoproliferación, principalmente en algunos individuos del grupo control (Tabla 3). Es posible que estos individuos, que residen en un país "endémico" para tuberculosis, hayan tenido sensibilización previa por infección natural con *M. tuberculosis* o por contacto con micobacterias atípicas, o hayan sido vacunados con BCG (como la mayoría de nuestros pacientes y controles). La respuesta *in vitro* sustenta la sensibilización previa y la reacción de hipersensibilidad tardía, por ser el resultado sumatorio de la respuesta celular que puede ser alterada y traducirse en una respuesta negativa, no siempre se correlaciona con el estado de sensibilización del huésped.

Otros investigadores han observado que en pacientes tuberculosos hay una respuesta disminuida a antígenos (28, 29). No obstante, llama la atención que las células de cinco de los pacientes del presente estudio, no proliferaron en respuesta al estímulo con PPD, pero sí lo hicieron con PHA. Los posibles mecanismos

para la supresión incluyen: a) la presencia de monocitos supresores en tuberculosis (30). b) La presencia de células T supresoras que expresan el receptor de células T CD3, las cuales liberan proteínas al medio de cultivo (como receptor soluble) que al unirse a otros antígenos como el PPD, inhiben la activación y proliferación de otras células T (31). c) Es posible que diferentes citoquinas como la IL-2 y la IL-1, así como productos micobacterianos sean elementos clave en este fenómeno de supresión (32).

El papel de las citoquinas en el control del crecimiento intracelular de la micobacteria es complejo y el perfil de las citoquinas liberadas *in vitro* son un indicativo de la función de los linfocitos T *in vivo*. Las células TCD4⁺ murinas se han dividido en dos subpoblaciones (Th1 y Th2) con base en el perfil de citoquinas liberadas por las mismas luego de la estimulación antigénica (33). Las células Th1 secretan IL-2 e interferón- γ (IFN α) mientras los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-10 (34).

Se ha encontrado en modelos murinos de tuberculosis, que hay una respuesta protectora inicial del tipo Th 1 seguida por una respuesta Th2, limitando la respuesta inflamatoria y disminuyendo el daño tisular en el sitio de la infección (35). En pacientes tuberculosos se ha determinado que la respuesta tipo Th2 es la predominante y juega un papel importante en la defectuosa resistencia del huésped a la infección (36, 37).

Con base en este modelo, los hallazgos de este estudio concuerdan con el hecho de que la respuesta inicial frente a la mico-

bacteria es del tipo Th1, en la cual el IFN- γ estimula la liberación de TNF α que actúa como un factor adicional activador de macrófagos. Posteriormente se presenta un desplazamiento en la respuesta hacia el tipo Th2, encontrándose un patrón mixto de respuesta Th1 + Th2 o Th0, el cual es el responsable del daño tisular inducido por TNF α (38).

Summary

Tumor Necrosis Factor (TNF) is a cytokine that plays a very important role in the pathogenesis of tuberculosis. As a product of monocytes-macrophages and lymphocytes it can exert both beneficial and detrimental effects on the outcome of infection with *M. tuberculosis*. In this study the bioassay using the L-929 fibroblast cell line was implemented to quantify the TNF levels in 14 patients and 15 healthy controls. All patients were diagnosed by microscopic identification of acid fast bacilli and the samples were obtained before treatment. The Tuberculin Test was applied to patients and controls, using the Mantoux procedure. Peripheral blood mononuclear cells were obtained for lymphoproliferation assays and the separation of adherent cells. The TNF levels were measured in culture supernatants of mononuclear cells and purified monocytes. The dose-response experiments showed 10 μ g/ml of PPD to be the optimal dose for proliferation and TNF induction. Comparing the TNF release by adherent cells (monocytes) and complete mononuclear cells (monocytes and lymphocytes) we found that both cell populations produce TNF spontaneously as well as in response to PPD and

that higher levels are released by monocytes. A statistically significant correlation between proliferation and TNF production was observed ($p=0.001$). Our findings concur with the Th 1 model in which IFN- γ is released during the response to infection inducing the subsequent release of TNF to control it.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a la Dra. Nancy Saravia, directora ejecutiva de la Corporación Cideim por el apoyo humano y científico durante la ejecución del proyecto y la revisión del manuscrito. Al Dr. Luis Fernando García, del Laboratorio Central de Investigaciones, Universidad de Antioquia, por sus generosos aportes durante el desarrollo del proyecto. Al Dr. Ernesto Jaramillo y la Liga Antituberculosa Colombiana por su ayuda en la evaluación de los pacientes. Al Dr. Fabio Carmona y la sección de bacteriología de la Universidad del Valle por su colaboración con las muestras bacteriológicas. A todo el equipo humano de la Corporación Cideim que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este estudio.

Referencias

- Wayne L. Microbiology of tubercle bacilli. *Am Rev Resp Dis* 1982; 3: 31-41.
- Dannenberg A. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology Today* 1991; 12: 228-233.
- Lama Selman M. Correlación clínica e inmunopatológica en la tuberculosis. *Rev Fac Med Mex* 1992.
- Styblo M. Tasa anual de infección tuberculosa y su tendencia en los países en desarrollo. *UIC* 1985; 53: 306-309.
- Kaufmann S, et al. Immunity against intracellular bacteria: biological effector functions and antigen specificity of T lymphocytes. *Curr Top Microb Immunol*; 138: 142-174.
- Bermúdez L, Young L. Tumor Necrosis Factor, alone or in combination with IL-12, but not INF γ , is associated with macrophage killing of *Mycobacterium avium* complex. *J Immunol* 1988; 140: 3006-3013.
- Flesh L, Kaufmann S. Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, Interleukin-4, and tumor necrosis factor. *Infect Immun* 1990; 58: 2675-2677.
- Kindler V, Shapiro A, Grau G, Piguet P, Vassilli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bacterial granulomas during BCG infection. *Cell* 1989; 56: 731-740.
- Rook G, Taverne J, Leveton C, Steele J. The role of gamma interferon, vitamin D₃, metabolites and tumor necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology* 1987; 62: 229-234.
- Barnes P, Fong S, Brennan P, Twomey P, Mazumder A, Modlin R. Local production of tumor necrosis factor and INF- γ in tuberculous pleuritis. *J Immunol* 1990; 145: 149-154.
- Shevach E. Introduction. *Curr Protoc Immuno*. Edited by current protocols. 1991; 6.0.3-6.0.6.
- Flick D, Gifford G. Comparison of in vitro cell cytotoxic assay for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* 1984: 167-175.
- Matthews N, Neale M. Cytotoxicity assay for anti-tumor cytotoxin. *Immunology* 1991; 44: 135-138.
- Rossio J, Rager H, Goundry C, Crips E. Cytokine testing in clinical trial monitoring. In: Rose N, DeMascario E, Fahey J, Friedman H. and Penn GM eds. Manual of clinical laboratory immunology. 4th ed. Washington DC: *Am Soc for Microbiol*; 1992: 942-947.
- Whistleside T. Cytokines and cytokine measurements in a clinical laboratory. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994; 1: 257-260.
- Mosmann T, Fong T. Specific assays for cytokine production by T cells. *J Immunol Methods* 1989; 116: 151-158.
- Carswell E, Old L, Kassel R, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3666-3670.
- Dofferhoff A, Esselink M, DE Vries-Hospers H, Zanten A, Boom V, Vellenga E. The release of endotoxin from antibiotic-treated *Escherichia coli* and the production of tumor necrosis factor by human monocytes. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31: 373-384.
- Opal S, Cross A, Kelly N, Sadoff J, Bodmer M, Palardy J, Victor G. Efficacy of a monoclonal antibody directed against tumor necrosis factor in protecting neutropenic rats from lethal infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 1990; 161: 1148-1152.
- Marks J, Marks C, Luce J, Montgomery A, Turner J, Mertz C, Murray J. Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock. Mortality rate, incidence of adult respiratory distress syndrome, and effects of methylprednisolone administration. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 94-97.
- Aderka D, Holtmann H, Toker I, Hahn T, Wallach D. Tumor necrosis factor induction by Sendai virus. *J Immunol* 1986; 136: 2938-2942.
- Barral-Netto M, Barado R, Barral A, Almeida R, Santos S, Badaro F, et al. Tumor necrosis factor (cachectin) in human Visceral Leishmaniasis. *J Infect Dis* 1991; 163: 853-857.
- Pisa P, Gennene M, Soder O, Ottenhoff T, Hanson M, Kiessling R. Serum tumor necrosis factor levels and disease dissemination in Leprosy and Leishmaniasis. *J Infect Dis* 1990; 988-981.
- Lovie A, Balch A, Smith R, Franke M, Ritz W, Singh J, Gordon M. Tumor necrosis factor alpha has a protective role in a murine model of systemic Candidiasis. *Infect Immun* 1994; 62: 2761-2772.
- Trinchieri G. Regulation of Tumor Necrosis Factor production by Monocyte-Macrophages and Lymphocytes. *Immunol Res* 1991; 10: 89-103.
- Takashima T, Ueta C, Tsuyuguchi, Kishimoto S. Production of Tumor Necrosis Factor Alpha by monocytes from patients with pulmonary Tuberculosis. *Infect Immun* 1990; 58: 3286-3292.
- Ogawa T, Uchida H, Kusumoto Y, Mori Y, Yamamura Y, Hamada S. Increase in the Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin 6 - Secreting Cells in the peripheral blood mononuclear cells from subjects infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1991; 59:3021-3025.
- McMurray D, Echeverry A. Cell-mediated immunity in anergic patients with pulmonary Tuberculosis. *Am Rev Resp Dis* 1978; 118: 827-834.
- Kleinhenz M, Ellner J. Antigen responsiveness during Tuberculosis: regulatory interactions of T-cell subpopulations and adherent cell. *J Lab Clin Med* 1987; 110: 31-40.
- Ellner J. Suppressor adherent cells in human Tuberculosis. *J Immunol* 1978; 121: 2573-2579.
- Abbas A, Lichtman A, Pober J. Cellular and Molecular Immunology. 1st ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1991: 214.
- Ellner J, Boom H, Edmons K, Rich E, Toosi Z, Wallis R. Regulation of the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. In: determinants of virulence and host response. Washington D.C. American Society for Microbiology; 1990: 77-91.
- Mosmann T, Cherwinski H, Bond M, Giedlin M, Coffman R. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348.
- Mosmann T, Coffman R. TH 1 and TH2 cells: Different pattern of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-173.
- Orme I, Robert A, Griffin J, Abrams J. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 1993; 151: 518-525.
- Surcel H, Trove-Biomberg M, Pauline S, Andersson G, Moreno C, Pasvol G, Ivanyi J. Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. *Immunology* 1994; 81: 171-176.
- Sánchez F, Rodríguez J, Agudelo G, García L. Immune responsiveness and lymphokine production in patients with Tuberculosis and healthy controls. *Infect Immun* 1994; 62: 5673-5678.
- Hernández-Pando R, Rook G. The role of TNF α in T-cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunology* 1994; 82: 591-595.