

EVALUACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN PACIENTES TUBERCULOSOS EMPLEANDO LA MODULACIÓN CON TEOFILINA

Diana DLUGOVITZKY (1), K. HUBER (2), G. WELKER (3) & O. MOLTENI (4)

RESUMEN

Se evaluaron las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias en pacientes con tuberculosis pulmonar antes y durante la terapia relacionando estos valores con la incidencia y evolución de la enfermedad.

Pacientes en sus diversas manifestaciones clínicas, vírgenes de tratamiento, se estudiaron por baciloscopia (BAAR), radiología, i.d.r. Mantoux y análisis complementarios.

Se cuantificaron mediante la prueba de Rosetas espontáneas (RE) linfocitos T totales y activos (RE a 4°C y 37°C), T colaboradores (RE Teofilina Resistentes: RETR) y supresores (RE Teofilina Sensibles: RETS). Los exámenes se repitieron en los mismos sujetos iniciado el tratamiento y en testigos sanos (TS).

Se demostró en los pacientes en todas sus formas clínicas un descenso significativo en los valores relativos y absolutos de células T y en la relación RETR/RETS (menor de 1). Existe asociación entre la forma clínica y el número de linfocitos T colaboradores.

Los pacientes en tratamiento con evolución favorable, evidenciaron un incremento significativo en los linfocitos T totales, activos, colaboradores y en la relación RETR/RETS.

Los enfermos con baciloscopia altamente positiva presentaron i.d.r. Mantoux baja o negativa y marcado descenso de células inmunocompetentes. Se comprobó asociación entre estas tres variables, lo mismo que entre el estado nutricional y la predisposición a contraer la enfermedad.

UNITERMOS: Tuberculosis; Subpoblaciones de linfocitos T; Teofilina.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una compleja interacción entre el sistema inmune del huésped y el parásito intracelular *Mycobacterium tuberculosis*^{1, 5, 6, 7, 10, 13, 24, 29}. Este bacilo ejerce una miríada de efectos

sobre el sistema inmune y fagocítico mononuclear, ya que puede funcionar provocando fenómenos inflamatorios e infecciosos severos, o bien actuar como adyuvante estimulando o alternati-

- (1) Investigadora del Consejo de Investigaciones de la U.N.R. Docente de la Cátedra de Microbiología, a cargo de la Sección Inmunología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina.
- (2) Docente e Investigadora de la Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina.
- (3) Médico del Hospital de Enfermedades Infecciosas V. L. Carrasco. Docente Cátedra de Enfermedades Infecciosas. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina.
- (4) Profesor Titular de la Cátedra de Microbiología, Parasitología y Virología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina.

Dirección para la Correspondencia: Dra. Diana Dlugovitzky. Maipú 1340 - P. Baja Dto. "D". 2000 Rosario - Argentina.

vamente deprimiendo la respuesta inmune^{1, 10, 17}. Se acepta universalmente que los fenómenos inmunológicos desempeñan un papel fundamental entre los mecanismos involucrados en la defensa contra el bacilo de Koch^{3, 7, 24, 26, 29}.

Se han estudiado diversos aspectos de gran importancia para la comprensión de las complejas interacciones entre el *Mycobacterium tuberculosis* y el huésped infectado tales como regulación genética y los marcadores fenotípicos de los linfocitos T humanos, la naturaleza de los receptores antigénicos en las células T, el procesamiento y presentación antigénica, las interacciones celulares que facilitan la adhesión molecular, así como las moléculas de superficie en las células fagocíticas que favorecen el ingreso de los patógenos a las células^{2, 15, 18, 21, 30} aunque interesa conocer aún más las alteraciones provocadas por el desequilibrio de las células inmunocomprometidas. Por ello la evaluación de las células que intervienen en la respuesta inmune celular, particularmente en las reacciones de hipersensibilidad retardada que se desencadenan en los pacientes tuberculosos no sólo nos permite interpretar la patogénesis de la enfermedad, sino explicar ciertos fenómenos relacionados con la evolución de los pacientes^{8, 16, 22} y su capacidad para responder a la terapia.

Por otra parte, es fundamental la interacción reguladora de las diversas poblaciones celulares que se generan ante una infección tuberculosa, responsables de la respuesta inmune del huésped, produciendo efectos tanto protectores como patógenos para el huésped.

En esta experiencia se estimaron las poblaciones linfocitarias de sangre periférica y las subpoblaciones funcionalmente distintas (linfocitos colaboradores y supresores) a fin de determinar si existe una correlación entre los niveles de células inmunocompetentes con las diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad y con las diferentes formas evolutivas mediante la modulación con teofilina.

El advenimiento de los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia subclases de linfocitos T ha permitido en algunas experiencias cuantificar estas subpoblaciones. LIMANIBUL Y SHOAT^{19, 27} demostraron que las células Teofi-

lina Resistentes y Sensibles con receptores Fc de la IgM, constituyen células "helper" o colaboradoras y supresoras que se corresponden a las subpoblaciones CD4 y CD8 respectivamente. Sin embargo las diferencias en los receptores de aquellas subpoblaciones (detectadas por su sensibilidad a la Teofilina) determina una mayor heterogeneidad de las mismas con respecto a CD4 y CD8. Por ello la aplicación de la técnica de LIMANIBUL no estima exactamente a estas últimas. Aún así esta metodología ha permitido cuantificar con cierta aproximación las diferentes subpoblaciones en los pacientes tuberculosos mediante una técnica accesible que podría aplicarse sin dificultad al seguimiento de los enfermos en los servicios asistenciales de mediana complejidad.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes: Se trabajó con pacientes tuberculosos con localización pulmonar, de ambos sexos y edades que oscilaron entre los 16 y 72 años, vírgenes de tratamiento, con baciloscopia positiva (BAAR: +) a los que se les efectuó exámenes clínicos, radiológicos, intradermo reacción de Mantoux (i. d. M) con PPD 2 U.T. y otros exámenes de laboratorio complementarios (Hemograma, Eritrosedimentación, Glicemia, Uremia) además de la confirmación del diagnóstico mediante cultivo en medio de Lowenstein Jensen.

De acuerdo a los datos obtenidos, los casos de tuberculosis fueron clasificados en relación a sus imágenes radiológicas, i. d. M y manifestaciones clínicas en: Leve (L), Moderadamente Avanzada (MA), Avanzada (A) y Grave (G).

El estudio se repitió en los pacientes bajo tratamiento mensualmente durante los cuatro meses después de iniciada la quimioterapia. Simultáneamente se siguió la evolución de los enfermos a través de controles clínicos, radiológico y bacilosκόpicos.

Todos los exámenes y determinaciones efectuados a los pacientes también se realizaron con un grupo testigo o control constituido por individuos sanos (TS) de ambos sexos y edades variables de la misma condición socio-económica de los enfermos. En este grupo testigo, se incluyeron algunos sujetos aleatoriamente (Testigos po-

blacionales) y también familiares o personas que convivían con los enfermos (Testigos convivientes sanos).

Determinación de células inmunocompetentes: Se cuantificaron los niveles de linfocitos T y las subpoblaciones de los mismos, T colaboradores y T supresores^{4, 31, 32}. Se practicó la prueba de hemocitoadherencia (Prueba de Rosetas espontáneas) que permite estimar linfocitos T totales y linfocitos T activos y una modificación de esta técnica basada en la sensibilidad a la teofilina^{19, 27}, determinando por este método linfocitos T colaboradores y supresores.

Prueba de hemocitoadherencia: En esta técnica la habilidad de los linfocitos T para formar rosetas espontáneas uniendo eritrocitos de carnero a su superficie es usada como marcador para tales células.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica heparinizada de donde se separaron los linfocitos a través de un gradiente de Ficoll-Hypaque, centrifugando a 400 g durante 45 minutos. Los linfocitos fueron resuspendidos en solución reguladora de fosfato (Phosphate Buffer saline: PBS) hasta lograr una concentración de 3.10^6 cell/ml.

Glóbulos rojos de carnero (GRC): se obtuvieron por punción venosa y se conservaron en solución de Alsever al 50%. Separados los GRC se lavaron 3 veces y resuspendieron en PBS al 0.5%.

Rosetas E Activas (REA): En cada prueba se incubó 0.20 ml de la suspensión de linfocitos con 0.20 ml de la suspensión de GRC en un baño a 37°C durante 5 minutos y se centrifugó a 400 g durante 5'. Se evaluaron al microscopio las células formadoras de rosetas, contando 200 linfocitos y las células que hubieran adherido dos o más GRC se consideraron linfocitos T.

Rosetas E Totales (RET): Se procedió en la misma forma que en la determinación de Rosetas E activas, pero luego de la incubación a 37°C y centrifugación posterior, se procedió a incubar la mezcla a 4°C durante 60'. La cuantificación microscópica permitió estimar los linfocitos T totales.

Rosetas E teofilina Resistentes (RETR): A través de la incubación de la suspensión de linfocitos, separados previamente a través del gradiente de Ficoll-Hypaque, con solución de Teofilina 5 mM durante una hora, se separaron las subpoblaciones de linfocitos T colaboradores (Teofilina resistentes) y supresores (Teofilina sensibles) que luego se cuantificaron por la Prueba de Rosetas espontáneas a 4°C y 37°C antes descripta^{19, 27}.

Análisis estadísticos: Se compararon los valores de Rosetas E y Rosetas E Teofilina Resistentes tanto totales (a 4°C) como activas (a 37°C) en ambos casos de los pacientes tuberculosos en sus diversas formas clínicas y del grupo TS, y también los datos de dichas determinaciones de los pacientes no tratados y de los mismos después de 4 meses de tratamiento. Teniendo en cuenta que los datos porcentuales de Rosetas no presentan una distribución normal, se transformaron obteniendo los valores de arco seno y se analizaron mediante el test de medias. Se evaluó la relación entre los niveles de Rosetas E (RE) y Rosetas E Teofilina Resistentes (RETR), en ambos casos tanto totales (4°C) como activas (37°C) y las diferentes manifestaciones clínicas. Para ello se confeccionaron tablas de contingencia, relacionando ambas variables y aplicando luego el test de independencia de χ^2 .

Por otra parte, las diferencias entre los valores absolutos de linfocitos T (obtenidos indirectamente a través de la determinación de Rosetas E y E activas, glóbulos blancos y fórmula leucocitaria del paciente) entre distintos estadios de TBC y los del grupo TS, se analizaron mediante el test de t Student.

Aplicando el test de asociación de χ^2 se estudió la relación entre baciloscopía (BAAR), estadios de la TBC y respuesta a la i.d.r. de Mantoux.

También se comparó por el test de medias la relación entre el valor del cociente RETR/RETS en distintas formas clínicas de la TBC con la de los TS. La asociación entre las manifestaciones clínicas de la enfermedad y estado nutricional se analizó por χ^2 .

RESULTADOS

Los resultados indican que los pacientes tuberculosos en todas las manifestaciones clínicas

de la enfermedad (L, MA, A, G) presentan un descenso en los niveles de células inmunocompetentes con respecto a los sujetos sanos, en sus valores porcentuales y absolutos. Se determinó en los pacientes vírgenes de tratamiento una disminución en los niveles de Rosetas E totales (RE a 4°C) y E activas (RE a 37°C) con respecto al grupo control o TS ($p < 0,01$).

Los valores absolutos de linfocitos T totales/ mm^3 y activos calculados con los correspondientes datos de Rosetas, glóbulos blancos y fórmula leucocitaria, también se hallaron significativamente disminuídos ($p < 0,01$).

Las estimaciones de las poblaciones linfocitarias en su conjunto no difirieron significativamente entre los grupos de pacientes con diferentes estados clínicos de tuberculosis, pero se verificó mediante pruebas estadísticas una fuerte asociación entre tales manifestaciones clínicas y el número de RETR.

La relación RETR/RETS que equivale a T colaboradoras/T supresoras fue menor a 1 en los pacientes no tratados y significativamente inferior a la determinada en el grupo TS ($p < 0,01$).

La marcada depresión de células inmunocompetentes de los pacientes antes del trata-

miento se modificó después de comenzado el mismo y a los 4 meses de su inicio se observó, particularmente en los enfermos con evolución favorable, un restablecimiento de los linfocitos T totales, activos y colaboradores (RET, REA, RETR a 4°C y 37°C). Las Tablas 1 y 2 resumen los resultados obtenidos en estos pacientes antes y después de iniciado el tratamiento, que difirieron significativamente ($p < 0,01$).

También se registró un aumento en la relación RETR/RETS cuyo valor fue superior a 1 en los sujetos tratados a excepción de aquellos pacientes con tuberculosis grave. La relación RETR/RETS fue más elevada en los pacientes sometidos a quimioterapia a la de estos sujetos antes de iniciar el tratamiento ($p < 0,01$) Tabla 3. El valor promedio del cociente RETR/RETS determinado en individuos normales (Testigos sanos) es 1.15 inferior al del cociente CD4/CD8 = 2, obtenido utilizando anticuerpos monoclonales.

Tal diferencia obedece según lo afirmado anteriormente, a que las poblaciones RETR/RETS evaluadas por el método de Rosetas + Teofilina, son heterogéneas con respecto a las poblaciones CD4 y CD8 y por ello la técnica empleada en este trabajo no detecta exactamente CD4/CD8.

TABLA 1

Celulas inmunocompetentes (C.I.) evaluadas por el test de rosetas totales activas y sensibles a la teofilina en pacientes tuberculosos virgenes de tratamiento y testigos sanos.

C.I. x ± s	Linfocitos T totales		Linfocitos T activos		RETR 4°C (%)	RETR 37°C (%)	RETS 4°C (%)	RETS 37°C (%)
	RET (4°C) %	Valor absoluto	RET (37°C) %	Valor absoluto				
L n = 17	37* ± 15.36	1004* ± 313.8	14.5* ± 7.1	622* ± 207.4	18.2* ± 7.04	7* ± 3.86	18.8 ± 8.34	7.5 ± 2.76
MA n = 39	34.8* ± 10.46	983* ± 428.4	19.3* ± 6.24	476* ± 184.1	13.7* ± 9	8.2* ± 7.97	21.1 ± 1.46	11.1 ± 8.1
A n = 36	33.8* ± 11.32	938* ± 330	17.7* ± 6.76	434* ± 130.91	15.6* ± 10.78	5.5* ± 5.11	18.2 ± 6.9	12.2 ± 5.4
G n = 18	34.9* ± 9.05	734* ± 189.6	18.7* ± 8.71	330* ± 98.2	12.2* ± 6.01	7.8* ± 4.43	22.7 ± 7.8	10.9 ± 6.4
TS n = 15	64* ± 8.07	1874* ± 503.7	29.93* ± 5.34	1078* ± 327.4	28.9* ± 6.2	15.06* ± 4.32	25.1 ± 6.7	12.87 ± 4.86

$\bar{x} \pm s$: média aritmética ± desvio standar; TBC: L: leve; MA: moderadamente avanzada; A: avanzada; G: grave; TS: testigos sanos; RET: rosetas E totales; REA: rosetas E activas; RETR: rosetas E teofilina resistentes; RETS: rosetas E teofilina sensibles; * RET (4°C), REA (37°C), RETR (4°C y 37°C) significativamente menores que los correspondientes valores de TS $p < 0,01$.

TABLA 2

Células inmunocompetentes (C.I.) evaluadas por el test de rosetas totales activas y sensibles a la teofilina en pacientes tuberculosos tratados.

C.I. Condición	Linfocitos T totales		Linfocitos T activos		RETR 4°C (%)	RETR 37°C (%)	RETS 4°C (%)	RETS 37°C (%)
	RET (4°C) %	Valor absoluto	RET (37°C) %	Valor absoluto				
L n = 12	59* ± 7.07	1727.5* ± 478.4	26* ± 8.48	966.48* ± 377.2	39* ± 21.21	16* ± 2.83	20 ± 12.1	10 ± 1.84
MA n = 28	54.3* ± 9.62	1589.2* ± 327.6	30* ± 8.09	1058.2* ± 3.46	29.7* ± 4.85	15.8* ± 6.12	24.6 ± 5.46	14.8 ± 2.16
A n = 36	59.6* ± 12.36	1693.7* ± 586.21	29.1* ± 6.43	1074.1* ± 302.1	33* ± 15.52	16.4* ± 9.62	26.60 ± 1.2	12.7 ± 3.42
G n = 18	56.7* ± 15.14	1662.25* ± 447.4	29.3* ± 15.53	1024.2* ± 296.4	25* ± 3	14* ± 4.58	31.70 ± 9.36	15.3 ± 6.28

$\bar{x} \pm s$: média aritmética ± desvío standar; TBC: L: leve; MA: moderadamente avanzada; A: avanzada; G: grave; RET: rosetas E totales; REA: rosetas E activas; RETR: rosetas E teofilina resistentes; RETS: rosetas E teofilina sensibles; * RET (4°C), REA (37°C), RETR (4°C y 37°C) significativamente superiores a los correspondientes valores de los pacientes pre-tratamiento (ver Tabla 1). $p < 0.01$.

TABLA 3

Relación linfocitos T colaboradores/T supresores (RETR/RETS) de pacientes pre-tratados, tratados y testigos sanos.

Condición	RETR/RETS	
	4°C ($\bar{x} \pm s$)	37°C ($\bar{x} \pm s$)
L	Pré-tratados	0.91 ± 0.25*
	Tratados	1.96 ± 0.33
MA	Pré-tratados	0.65 ± 0.19*
	Tratados	1.21 ± 0.30
A	Pré-tratados	0.86 ± 0.13*
	Tratados	1.24 ± 0.12
G	Pré-tratados	0.54 ± 0.3*
	Tratados	0.79 ± 0.20
TS		1.15 ± 0.43

RETR: rosetas E teofilina resistentes; RETS: rosetas E teofilina sensibles; TBC: L: leve; MA: moderadamente avanzada; A: avanzada; G: grave; TS: testigos sanos; $\bar{x} \pm s$: média aritmética ± desvío standar; * Diferencias significativas entre pacientes pre-tratados y tratados ($p < 0.01$) y pre-tratados y TS ($p < 0.01$).

Los pacientes con baciloscopia (BAAR) altamente positiva, y algunos de ellos anérgicos o con baja respuesta frente a la i.d.r de Mantoux 2 U.T., evidenciaron una marcada deficiencia de células inmunocompetentes. Se demostró asociación entre estas tres variables ($p < 0.01$) Tabla 4.

TABLA 4

Asociación entre baciloscopia (BAAR), intradermo-reacción de Mantoux (PPD 2 UT) y nivel de células inmunocompetentes (NCI) en pacientes tuberculosos vírgenes de tratamiento en sus diferentes manifestaciones clínicas.

BAAR	PPD 2 UT	NCI			N°
		N	MD	D	
1	(-)	16.66%	44.44%	38.88%	18
	(+)	50%	—	50%	12
2	(-)	30%	10%	60%	16
	(+)	—	—	—	—
3	(-)	—	33.33%	66.66%	16
	(+)	—	50%	50%	12
4	(-)	25%	25%	50%	8
	(+)	—	—	—	—

BAAR: 1: +, 2: ++, 3: +++, 4: ++++; PPD 2 UT: (-): 0 10 mm², (+): 10 mm²; n°: número de pacientes; NCI: Porcentaje de individuos que presentó valores normales (N), Medianamente Disminuidos (MD) o Disminuidos (D) con respecto a los de los Testigos Sanos.

La evaluación de los niveles de proteínas séricas y los valores de cada una de ellas, en especial el de albúmina, se utilizó para determinar el estado nutricional de los pacientes. Se comprobó que el porcentaje de individuos con un déficit nutricional era superior en los enfermos que en los TS, aunque tal deficiencia en la nutrición no está asociada a la manifestación clínica de la Enfermedad (Tabla 5).

TABLA 5
Estado nutricional en diferentes manifestaciones de TBC y testigos sanos (TS).

TBC	L n = 12	MA n = 28	A n = 22	G n = 8	TS n = 15
Proteínas totales	5.45	4.9	4.92	5.1	7.59
$\bar{x} \pm s$	\pm 0.5	\pm 0.41	\pm 0.37	\pm 0.5	\pm 0.31
Albumina	2.72	2.46	2.52	2.4	3.7
$\bar{x} \pm s$	\pm 0.57	\pm 0.56	\pm 0.48	\pm 0.63	\pm 0.28

TBC: L: leve; MA: moderadamente avanzada; A: avanzada; G: grave; $\bar{x} \pm s$: media aritmética \pm desvío estandar.

DISCUSIÓN

Los datos reportados en este trabajo se suman a los de otros autores que demuestran el amplio espectro de fenómenos supresivos y fallas en los mecanismos inmunológicos que se ponen en evidencia en los individuos tuberculosos, aunque no siempre es posible relacionarlas a las diversas formas clínicas de la enfermedad.

Nuestros resultados demuestran que los tuberculosos en todas las manifestaciones clínicas cursan con una disminución en el tráfico de células comprometidas en la respuesta inmune celular, que en esta experiencia se pone de manifiesto a través de un descenso en los niveles de linfocitos T totales, activos y colaboradores.

No se proporcionan en la bibliografía los valores de linfocitos T totales y activos ni los de la relación T "helper"/supresores en las diferentes manifestaciones de tuberculosis. Los valores que se informan en este trabajo son el promedio de tales datos, determinados experimentalmente en la población de pacientes estudiada.

La frecuencia de pruebas tuberculino-negativas se asoció a la infección masiva o la supresión de la inmunidad que se manifestaría como una disminución de linfocitos T colaboradores o a un incremento de los linfocitos T supresores.

Diversas experiencias evidenciaron que la energía frente al test de tuberculina o PPD, que es específica a la respuesta frente a los productos de *Mycobacterias* en algunos pacientes, puede

estar asociada con niveles elevados de anticuerpos anti-*Mycobacteria*¹⁰.

Durante el tratamiento del paciente inicialmente anérgico los fenómenos de hipersensibilidad retardada (DTH) se desarrollan y en consecuencia declinan los niveles de anticuerpos.

A través de experimentos in vitro se han demostrado constituyentes mycobacterianos que son potencialmente inmunosupresivos y la existencia de circuitos de células supresoras operantes en enfermos tuberculosos. Es posible dicotomizar los antígenos mycobacterianos en aquellos que activan los mecanismos protectores y los que inducen células supresoras¹⁰.

Otros experimentos in vitro permitieron evidenciar los mecanismos que resaltan la depresión de las respuestas a tuberculina y PPD¹⁰. En pacientes con tuberculosis recientemente diagnosticada, los test tuberculino-negativos han sido asociados con blastogenesis deprimida, inducida por PPD en las células mononucleares en sangre periférica¹⁷.

Se ha demostrado que las respuestas blastogénicas inducidas por tuberculina están correlacionadas con la producción de interleukina 2 (IL-2). En estos estudios la depleción de células adherentes incrementó la producción de IL-2¹⁷.

Por otra parte, en enfermos tuberculosos la depleción de células no adherentes resultó en una producción disminuída de IL-2 ante la estimulación mediada por PPD¹⁷.

La protección contra la tuberculosis y la patogénesis de la misma depende en gran medida de células T específicas que mediarían la activación de los macrófagos y a estas poblaciones celulares se las considera las principales responsables de la respuesta del huésped en esta enfermedad.

La restricción del crecimiento celular de bacilo depende de la interacción entre las diferentes poblaciones celulares de linfocitos y los macrófagos intervinientes^{10, 13, 29}.

ROOK y colab. sugirieron, a través de sus estudios de nódulos linfáticos en tuberculosos

y sujetos normales, la existencia de un atrapamiento de los linfocitos antígeno-reactivos en pacientes con enfermedad severa, especialmente en aquellos con respuesta tuberculínica baja o negativa²⁵. Esto explicaría la deficiencia de los linfocitos T en sangre periférica de los pacientes tuberculosos.

Diversos autores se hallan abocados a lograr nuevos conocimientos de los mecanismos celulares y moleculares operantes en la resistencia del huésped al bacilo tuberculoso^{9, 14, 16, 20, 23} ya que aún es necesario profundizar lo investigado sobre dichos aspectos.

Mediante estudios *in vitro*, utilizando anticuerpos monoclonales se ha provocado una depleción selectiva de CD4 y CD8 determinando a la vez las actividades de estas líneas celulares¹⁶. Se evidenció que en la tuberculosis experimental se generan ambas subpoblaciones CD4 y CD8 y desempeñan un papel protector tanto en los fenómenos que intervienen las células colaboradoras como las citotóxicas.

Estas células expresan su actividad a través de diversos mecanismos contra la patogénesis de la enfermedad¹⁶.

Se han evaluado sustancias biológicamente activas elaboradas en dicha respuesta celular. Así por ej. se han estudiado las linfoquinas producidas predominantemente en la tuberculosis, que incluyen factores activadores de linfocitos y macrófagos, especialmente interferón γ ²⁵.

En la lesión tuberculosa las linfoquinas producidas por las células T locales causan acumulación y activación de los macrófagos y de linfocitos adicionales que a veces determinan la desaparición de la lesión. También el factor de necrosis tumoral α y el β contribuyen al daño tisular hallado en la enfermedad²⁵.

La circunstancia de que los pacientes con evolución clínica favorable que evidenciaron capacidad para responder a la quimioterapia, presentando niveles de células inmunocompetentes y en particular células colaboradoras notablemente superiores, permite atribuir al sistema inmune un rol preponderante en la modulación de los fenómenos protectores que se desencadenan ante una infección por bacilo de Koch.

Los resultados de los controles de seguimiento de los enfermos en tratamiento con evolución favorable demostraron una elevación en la relación Rosetas E Teofilina Resistentes/Rosetas E Teofilina Sensibles. Se deduce que la cuantificación seriada de células inmunocompetentes permite evaluar la capacidad de protección inmune que se genera en los individuos infectados. Teniendo en cuenta que la técnica empleada no es de excesiva complejidad y brinda datos valiosos para interpretar diversos fenómenos, sería de utilidad como método accesible en el estudio inmunológico y evolutivo de la enfermedad.

En nuestro experimento se verificó también que un porcentaje considerable de los individuos enfermos evidenciaron un déficit nutricional que se puso de manifiesto a través de parámetros tales como proteinemia total y albuminemia, inferiores a los valores obtenidos en los sujetos sanos.

La mal nutrición puede haber sido el factor subyacente de las deficiencias inmunológicas detectadas en algunos pacientes.

Los datos obtenidos permiten concluir que en la tuberculosis pulmonar en sus diferentes formas clínicas (L, MA, A y G) existe una disminución en la cantidad relativa y absoluta de linfocitos T, responsables de la respuesta inmune celular. Los valores de Rosetas E Totales, teofilina sensibles y resistentes (a 4°C y 37°C) no difirieron significativamente entre estos grupos de enfermos aunque se evidenció asociación entre la manifestación clínica de la enfermedad y la proporción de linfocitos T colaboradores. Además los pacientes que presentaron niveles más altos en los controles seriados efectuados después de iniciada la quimioterapia, evolucionaron favorablemente y respondieron al tratamiento.

Esto confirma también que están involucradas ambas poblaciones linfocitarias, tanto colaboradoras como supresoras. La protección que ejercerían las mismas contra la patogénesis de la enfermedad depende de la relación o balance entre estos dos tipos de células T.

Se demostró asociación entre la baciloscopia y la respuesta a la i.d.r. de Mantoux y el número de células inmunocompetentes.

También se ha constatado en un elevado número de pacientes un marcado déficit nutricional asociado con la predisposición a contraer la enfermedad.

SUMMARY

T lymphocyte subsets evaluation in patients with pulmonary tuberculosis using theophylline modulation.

T cells and T cells subsets in peripheral blood of patients with different forms of pulmonary tuberculosis were evaluated to explain some aspects of the immunocompromised state of these subjects.

Diagnosis was made by bacilloscopy (BAAR), chest roentgenography i.d.r Mantoux, and other clinical analysis.

Spontaneous E-Rosette test (RE) was used to quantify Total (RET 4°C) and Active T cells (REA 37°C) and the same test after incubation with Theophylline (The) for helper cells (The-resistant cells: RETR) and suppressor cells (The-sensitive cells: RETS). Patients were followed for at least 4 months after therapy.

The data demonstrate a significant decrease of relative and absolute numbers of Total T-cells and a diminished T helper/T suppressor subset ratio (RETR/RETS) which dropped to less than 1 in untreated patients.

Treated patients with a favourable evolution showed a restoration of Total active and helper T cells. RETR/RETS ratio was also significantly increased.

In patients with highly positive BAAR, low on negative i.d.r Mantoux, a decreased level of immunocompetent cells was observed. The 3 aspects were associated.

Nutritional condition of the patients was also associated with the predisposition to acquire this disease.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEN, E. M.; STERNICK, J. L.; SCHRIER, D. J. & MOORE, V. L. — BCG induced chronic pulmonary inflammation

and splenomegaly in mice: suppression of PHA induced proliferation delayed hypersensitivity to sheep erythrocytes and chronic pulmonary inflammation by soluble factors from adherent spleen cells. *Cell. Immunol.*, 58: 61-71, 1981.

2. BOOM, W. H.; HUSSON, R. N.; YOUNG, R. A.; DAVID, J. R. & PIESSENS, W. F. — In vivo and in vitro characterization of murine T cell clones reactive to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, 83: 7013-7117, 1987.

3. COLLINS, F. M. & CAMPBELL, S. G. — Immunity to intracellular bacteria. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 3: 5-66, 1982.

4. COOMBS, R. R. A.; GURNER, B. W.; WILSON, A. B.; HOLM, G. & LUSCHGRIN, B. — Rosette information between human lymphocytes and sheep red cells not involving immunoglobulin receptors. *Int. Arch. Allergy*, 39: 658-665, 1970.

5. DANIEL, T. M. — The immunology of tuberculosis. *Clin. Chest Med.*, 1: 189-201, 1980.

6. DANIEL, T. M.; OXTOBY, M. J.; PINTO, R. & MORENO, E. — The immune spectrum in patients with pulmonary tuberculosis. *Amer. Rev. resp. Dis.*, 123: 556-559, 1981.

7. DANNEBERG, A. M. — Pathogenesis of tuberculosis: native and acquired resistance in animals and humans microbiology. Washington, American Society for Microbiology, 1984. p. 344-354.

8. DANNEBERG, JR, A. M. — Pathogenesis of pulmonary tuberculosis. In: FISHMAN, A. P., ed. *Pulmonary diseases and disorders*. 2 nd. ed. New York, Mac Graw-Hill, 1988. p. 1821-1842.

9. DE LIBERO, G.; FLESCHE, I. & KAUFMANN, S. H. E. — *Mycobacteria* reactive Lyt 2⁺ T-cell lines. *Europ. J. Immunol.*, 18: 59-66, 1987.

10. ELLNER, J. J. & WALLIS, R. S. — Immunologic aspects of mycobacterial infections. *Rev. infect. Dis.*, 11 (Suppl. 2): S455-S459, 1989.

11. ESTRADA PARRA, S. — La respuesta inmunológica en la tuberculosis. *Salud publ. Méx.*, 25: 403-409, 1983.

12. FUJIWARA, H.; OKUDA, T.; FUKUKAWA, T. & TSUYOGUCHI, I. — In vitro tuberculin reactivity of lymphocyte from patients with tuberculosis pleuresy. *Infect. Immun.*, 35: 402-409, 1982.

13. HAHN, H. & KAUFMANN, S. H. E. — The role of cell-mediated immunity in bacterial infections. *Rev. infect. Dis.*, 3: 1221-1250, 1981.

14. KAUFMANN, S. H. E. & FLESCHE, I. — Function and antigen recognition pattern of L₃T₁ T-cells clones from *Mycobacterium tuberculosis* immune mice. *Infect. Immun.*, 54: 291-296, 1986.

15. KAUFMANN, S. H. E.; VATH, V.; THOLE, J. E. R.; VAN EMBDEN, J. D. A. & EMMRICH, F. — Enumeration of T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis* organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64-KDa protein. *Europ. J. Immunol.*, 17: 351-357, 1987.

DLUGOVITZKY, D.; HUBER, K.; WELKER, G. & MOLTENI, O. — Evaluación de las subpoblaciones de linfocitos T en pacientes tuberculosos empleando la modulación con teofilina. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 33(2): 105-113, 1991.

16. KAUFMANN, S. H. E. — In vitro analysis of the cellular mechanisms involved in immunity to tuberculosis. *Rev. infect. Dis.*, 11 (Suppl. 2): S448-S459, 1989.
 17. KLEINHENZ, M. E. & ELLNER, J. J. — Antigen responsiveness during tuberculosis: regulatory interactions of T cell subpopulations and adherent cells. *J. Lab. clin. Med.*, 110: 31-40, 1987.
 18. LAMB, J. R.; IVANYI, J.; REES, A.; YOUNG, R. A. & YOUNG, A. B. — The identification of T cells, epitopes in *Mycobacterium tuberculosis* using human T lymphocyte clones. *Leprosy Rev.*, 57: 131-137, 1986.
 19. LIMAMBUL, S.; SHORE, A.; DOSCH, N. M. & GELFAND, W. — Theophylline modulation of E rosette formations: an indicator of T-cell maturation. *Clin. exp. Immunol.*, 33: 503-508, 1978.
 20. MÜLLER, I.; COBBOLD, S. P.; WALDMAN, H. & KAUFMANN, S. H. E. — Impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection after selective in-vivo depletion of L_2T_4 and $Lyt2^+$ T cells. *Infect. Immun.*, 55: 2037-2041, 1987.
 21. OFTUNG, F.; MUSTAFA, A. S.; HUSSON, R. A. & GODAL, T. — Human T cell clones recognize two abundant *Mycobacterium tuberculosis* protein antigens expressed in *Escherichia coli*. *J. Immunol.*, 138: 927-931, 1987.
 22. ORME, I. A. & COLLINS, F. M. — Adoptive protection of *Mycobacterium tuberculosis* infected lung: dissociation between cells that passively transfer protective immunity and those that transfer delayed type hypersensitivity to tuberculin. *Cell. Immunol.*, 84: 113-120, 1984.
 23. ORME, I. M. — The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.*, 138: 293-298, 1987.
 24. PIESSENS, W. F. — Introduction to the immunology of tuberculosis. *Rev. infect. Dis.*, 11 (Suppl. 2): S436-S441, 1989.
 25. ROOK, G. A. W. — Role of activated macrophages in the immunology of tuberculosis. *Brit. med. Bull.*, 44: 611-623, 1988.
 26. ROOK, G. A. W.; CARSWELL, J. W. & STANFORD, J. J. — Preliminary evidence for trapping of antigen specific lymphocytes in the lymphoid tissue of anergic tuberculosis patients. *Clin. exp. Immunol.*, 26: 129-132, 1976.
 27. SHOAT, B. & JOSHNA, H. — Suppressor helper and immunoregulatory T cells in normal human blood as defined by theophylline sensitivity. *Thymus*, 4: 323, 1982.
 28. SMITH, D. W. & WEIEGESHAUS, E. H. — What animal models can teach us about the pathogenesis of tuberculosis in man. *Rev. infect. Dis.*, 11 (Suppl. 2): S385-S393, 1989.
 29. STEEL, J.; FLINT, K. C.; POZNICK, A. L.; HUDSPITH, B.; JOHNSON, M. M. & ROOK, G. A. W. — Inhibition of virulent *Mycobacteria tuberculosis* by murine peritoneal macrophages and human alveolar lavage cells. The effect of lymphokines and recombinant gamma interferon. *Tubercle*, 67: 289-294, 1986.
 30. VRIES, R. R. P. — Regulation of T cell responsiveness against mycobacterial antigens by HLA class 2 immune response genes. *Rev. infect. Dis.*, 11 (Suppl. 2): S400-S403, 1989.
 31. WYBRAM, J. — The human rosette forming cells as a marker of a population of thymus derived cells. *J. clin. Invest.*, 51: 2537-2545, 1972.
 32. WYBRAM, J. — Rosette forming cells in immunologic deficiency diseases and transfer factor. *New Engl. J. Med.*, 281: 710-716, 1973.
- Recebido para publicação em 21/6/1990.
Aceito para publicação em 1/3/1991.