



Original

Eje interleucina 12/interferón gamma en pacientes de tuberculosis en una región europea con alta incidencia de enfermedad

Luis Anibarro^a, Elina Garet^{b,*}, Irene Felpeto^c, Víctor del Campo^c, Julio Montes^d y África González-Fernández^b

^aUnidad de Tuberculosis, Servicio de Medicina Interna, Complejo Hospitalario de Pontevedra, Pontevedra, España

^bÁrea de Inmunología, Edificio de Ciencias Experimentales, Universidade de Vigo, Vigo, España

^cServicio de Medicina Preventiva, Complejo Universitario de Vigo, Vigo, España

^dServicio de Medicina Interna, Complejo Universitario de Vigo, Vigo, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 3 de diciembre de 2010

Aceptado el 1 de febrero de 2011

Palabras clave:

Tuberculosis

Inmunología

Inmunidad celular

Interleucina-12

Interferon-gamma

R E S U M E N

La integridad del eje interleucina 12/interferón gamma (IL-12/INF- γ) es esencial para un correcto control de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. El objetivo del presente estudio fue evaluar si la alta incidencia de tuberculosis (TB) en Galicia (España) podría estar relacionada con una respuesta alterada en el eje IL-12/INF- γ en los pacientes con TB. Se estudió a 20 enfermos con TB y 21 controles sanos: 7 con prueba de la tuberculina positiva (PT+) y 14 con prueba de la tuberculina negativa (PT-). El estudio del eje IL-12/INF- γ se realizó mediante la determinación de los niveles de INF- γ y la expresión celular de los receptores IL-12R β 1 e INF- γ R1 en linfocitos y monocitos, respectivamente. Los ensayos se realizaron tanto a nivel basal, como tras estimulación mediante incubación in vitro de células mononucleares de sangre periférica con fitohemaglutinina (PHA) y derivado proteico purificado (PPD). Se analizaron y compararon las respuestas de los enfermos y de los controles sanos. La estimulación in vitro con PHA y PPD incrementó de forma significativa los niveles de INF- γ , y la expresión celular de los marcadores IL-12R β 1 y INF- γ R1 respecto a los niveles basales, tanto en el grupo de enfermos con TB, como en el de controles sanos (con PT+ y PT-). Todo ello es indicativo de una respuesta inmunitaria adecuada en todos los grupos, en los que la funcionalidad del eje IL-12/INF- γ está conservada en los pacientes analizados con TB en Galicia. Aunque nuestro estudio no ha analizado todas las vías de alteración posibles del eje IL-12/INF- γ , las altas tasas de enfermedad que históricamente se observan en esta comunidad no parecen estar causadas por una disfunción de la respuesta inmunitaria a este nivel.

© 2011 Publicado por Elsevier España, S. L. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: melgaret@uvigo.es (E. Garet).

Interleukin-12/interferon-gamma axis in TB patients in a European region with a high incidence of disease

ABSTRACT

Keywords:

Tuberculosis
Immunology
Cellular immunity
Interleukin-12
Interferon-gamma

The integrity of the interleukin 12/interferon gamma (IL-12/INF- γ) axis has been shown to be essential in the control of the *Mycobacterium tuberculosis* infection. The aim of this study was to assess whether the high incidence of tuberculosis (TB) in Galicia, Spain, could be related to an altered response in the IL-12/INF- γ axis in patients with TB. We studied 20 TB patients and 21 healthy controls: 7 with positive Tuberculin Skin test (TST+) and another 14 with TST-. The study of the IL-12/INF- γ axis was conducted by the analysis of INF- γ levels (in serum and supernatants of non-activated and activated cells) and by the cellular expression of IL-12R β 1 and INF- γ R1 in lymphocytes and monocytes, respectively. The assays were performed at baseline levels and after *in vitro* stimulation of peripheral blood mononuclear cells with phytohaemagglutinin (PHA) and purified protein derivative (PPD). Responses in patients and in healthy controls were analysed and compared. PHA and PPD *in vitro* stimulation significantly increased INF-gamma levels and the cellular expression of IL-12R β 1 and INF- γ R1 receptors compared to baseline levels in both TB patients and healthy controls (either with positive or negative TST). Our results suggest that there is an adequate immune response in all groups. Although the IL-12/INF- γ axis may have other abnormalities not analysed in this work, the functionality of the IL-12/INF- γ axis is preserved in the patients analysed with TB in Galicia. The high rates of disease historically observed in this community does not seem to be caused by a malfunction of the immune response at this level.

©2011 Published by Elsevier España, S. L. All rights reserved.

Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad de alta incidencia y prevalencia en el mundo, que llevó a la propia Organización Mundial de la Salud a declararla ya en el año 1993 emergencia global¹, situación que se mantiene hoy día con una prevalencia mundial estimada de 14 millones de casos². Sin embargo, se estima que únicamente un 10% de pacientes con infección tuberculosa llegarán a desarrollar TB en algún momento de su vida. No es posible determinar con exactitud qué personas infectadas van a desarrollar enfermedad. Sin embargo, sí son bien conocidas una serie de condiciones de mayor riesgo de progresión de infección latente a enfermedad, en relación con alteraciones del sistema inmunitario, como son la coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y otras situaciones en los que la integridad de la respuesta inmunitaria celular puede estar alterada³.

En los últimos años varios grupos de trabajo están realizando grandes esfuerzos por conocer la importancia de esta respuesta celular y de todos sus componentes. Los macrófagos, la subpoblación de linfocitos T helper tipo 1 (Th1), y en especial el eje interleucina 12/interferón gamma (IL-12/INF- γ), han demostrado que son de importancia crucial para el control de la infección tuberculosa⁴⁻⁷.

La inmunidad mediada por células es la principal línea de defensa frente a patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*. Macrófagos infectados liberan IL-12 que induce la

proliferación de células T y su diferenciación hacia linfocitos Th1 (fig. 1). La subpoblación Th1 produce interferón gamma (INF- γ), el cual, además de estabilizar el fenotipo Th1, activa

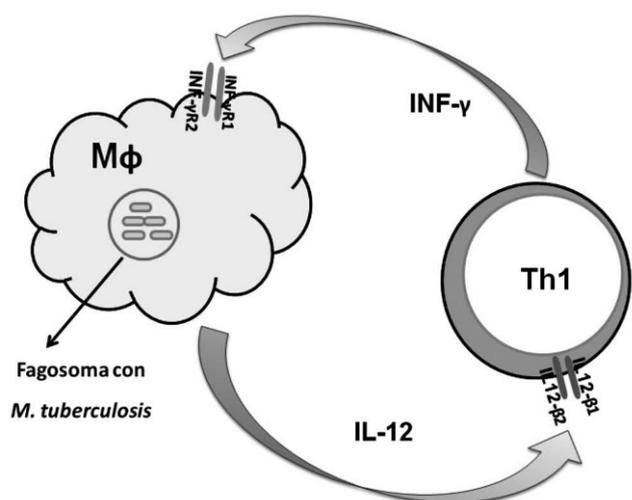


Figura 1 - Esquema del eje IL-12/INF- γ durante la respuesta inmunitaria frente al patógeno intracelular *Mycobacterium tuberculosis*. IL-12: interleucina 12; IL-12R β 1 y β 2: subunidades de receptor para IL-12; INF- γ : interferón gamma; INF- γ R1 y INF- γ R2: subunidades de receptor para INF- γ ; M ϕ : macrófago; Th1: linfocito T helper tipo 1.

a los macrófagos potenciando su capacidad de destruir al patógeno. La mayoría de las células linfoides expresan el receptor para INF- γ , formado por las subunidades R1 (INF- γ R1) y R2 (INF- γ R2), mientras que las células T y las células *natural killer* (NK) activadas expresan las cadenas beta 1 y beta 2 del receptor para la IL-12 (IL-12R β 1 y IL-12R β 2). La integridad del eje IL-12/INF- γ puede estudiarse midiendo la respuesta a estimulación *in vitro* de los niveles de IL-12, INF- γ y mediante la expresión de los receptores para cada una de estas citocinas⁸.

A pesar de que la incidencia de TB sigue un patrón inverso al nivel de desarrollo socioeconómico de los pueblos, Galicia (región del noroeste de España) ha presentado históricamente unas tasas muy elevadas de enfermedad para su nivel de desarrollo económico y social^{9,10}, con uno de los niveles de incidencia de TB más elevados de España y de Europa Occidental. La prevalencia de infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), así como la presencia de inmigrantes entre los pacientes con TB, es baja en esta comunidad, por lo que las razones de la elevada incidencia de enfermedad tuberculosa no se conocen bien.

Algunos estudios han demostrado la existencia de grupos poblacionales que presentan una alta susceptibilidad para el desarrollo de enfermedad tuberculosa¹¹⁻¹⁴, debido a alteraciones en los niveles de secreción de INF- γ , o en el de la expresión, o funcionalidad de los receptores para INF- γ e IL-12, por lo que nuestro grupo se planteó la hipótesis de que la alta incidencia de TB en Galicia podría deberse a una respuesta alterada del eje IL-12/INF- γ en los pacientes gallegos.

Material y métodos

Población de estudio

Se estudió a 20 enfermos adultos con diagnóstico reciente de TB pulmonar con confirmación microbiológica y 21 controles sanos (voluntarios con actividad normal, sin datos de enfermedad ni otra afección, y sin antecedentes epidemiológicos conocidos de TB, ni factores de riesgo de progresión a enfermedad tuberculosa). Todos ellos pertenecían a las áreas sanitarias de Vigo y Pontevedra (Galicia [España]) y eran gallegos de origen. Para el estudio se excluyó a los pacientes con serología positiva para el VIH o que recibieran tratamiento inmunodepresor.

Estudio del eje IL-12/INF- γ

En todos los pacientes y controles se estudió el eje IL-12/INF- γ mediante la cuantificación de los niveles de producción de INF- γ , expresión linfocitaria de IL-12R β 1 y expresión de INF- γ R1 en macrófagos, tanto a nivel basal como tras estimulación mediante incubación *in vitro* durante 3 días con fitohemaglutinina (PHA) (activador policlonal) y 7 días con derivado proteico purificado (PPD) como activador específico¹⁵. En los pacientes del grupo control, inmediatamente después de la extracción de la muestra, se les realizó la prueba intradérmica de la tuberculina (PT) según la técnica de Mantoux, inyectando intradérmicamente en la cara ventral del antebrazo

0,1 ml (2 UT) de PPD RT-23 (Evans, Celltech Pharma SA, Madrid [España]). La lectura se realizó a las 48-72 h y se consideró positiva si la induración era mayor o igual de 15 mm. A pesar de que las recomendaciones establecidas por la Sociedad Española de Patología Respiratoria marcan 5 mm como punto de corte de positividad¹⁶, se decidió considerar la prueba positiva con una induración mayor o igual de 15 mm, tanto en no vacunados, como en vacunados con bacilo Calmette-Guérin (BCG), por tratarse de pacientes sin antecedentes epidemiológicos conocidos de contacto con TB, ni factores de riesgo personales de progresión a enfermedad¹⁷. La comprobación de la vacunación con BCG fue mediante certificación escrita o comprobación de cicatriz posvacunal en región deltoidea o escapular.

Obtención de muestras y análisis de laboratorio

Se obtuvieron muestras de sangre periférica mediante punción venosa con mariposa en tubos Vacutainer, con y sin anticoagulante, inmediatamente después del diagnóstico. Los tubos sin anticoagulante se incubaron 6 horas a 4 °C y luego se centrifugaron a 3.000 rpm y 4 °C durante 15 minutos. Posteriormente, se recogió el suero y se almacenó a -80 °C hasta su análisis. A partir de sangre con anticoagulante, se obtuvieron las células mononucleares por centrifugación en gradiente de densidad usando Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Uppsala [Suecia]). Para ello se colocaron 7 ml de sangre diluida 1:2 con medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen [Escocia]) sobre 3 ml de Ficoll en tubos Falcon de 15 ml y fueron centrifugados a 1.800 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se recogió la banda de la interfase y se lavó dos veces con medio completo (RPMI 1640 suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina (GIBCO, Invitrogen Incorporation, Paisley [Escocia]) y 10% de suero fetal bovino (PAA Laboratories [Austria]). La concentración y viabilidad celular fueron determinadas por recuento con azul tripán en cámara de Neubauer bajo microscopio óptico.

Expresión de IL-12R β 1 e INF- γ R1

Se analizó la expresión de las subunidades IL-12R β 1 e INF- γ R1 en linfocitos y macrófagos, respectivamente, tanto a nivel basal como tras activación celular con PHA y PPD, mediante inmunofluorescencia directa. La expresión de los receptores tras activación celular se determinó mediante el cultivo de 1×10^6 células mononucleares en 1 ml de medio completo en presencia de PHA (10 μ g/ml) (SIGMA), o PPD (RT 23, Evans) (600 U/ml), a 37 °C y 5% de CO₂ durante 3 y 7 días respectivamente, según lo descrito por Kori et al¹⁵. Transcurrido ese tiempo, se recogieron las células, se centrifugaron y su sobrenadante se almacenó a -80 °C para estudios posteriores. Para despegar a los monocitos adheridos, se añadió 1 ml de EDTA 0,5 M a 37 °C durante 10 minutos. El estudio de inmunofluorescencia se realizó con 5×10^5 células en 50 μ l de medio completo y 10 μ l de los anticuerpos monoclonales correspondientes: anti-IL-12R β 1-RPE o anti- INF- γ R1-FITC (R&D Systems [Estados Unidos]) a 4 °C, en oscuridad, durante 45 minutos. Se lavaron

con 3 ml de medio completo, se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 600 μ l de formaldehído al 0,1%. Las muestras fueron analizadas en citómetro de flujo (Beckman Coulter, Epics XL-MCL). Los datos obtenidos se analizaron utilizando el programa MXP versión 2.0 para Cytomics FC 500 (Beckman Coulter). La expresión de receptores IL-12 γ 1 y de INF- γ R1 se determinó como el porcentaje de células que expresaban el receptor. Las poblaciones de linfocitos y monocitos se determinaron a partir de su tamaño y complejidad (FSC/SSC), y posteriormente confirmadas con los marcadores CD3-FITC y CD14-FITC (Beckman Coulter), respectivamente, en ensayos independientes siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Determinación de la producción de INF- γ

La producción de INF- γ tanto a nivel basal (en muestras de suero) como tras activación celular (en los sobrenadantes de las células estimuladas), se determinó mediante el uso del ELISA comercial OptEIA, Human INF- γ ELISA SET (BD Biosciences [Estados Unidos]), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Placas de ELISA (Corning Incorporated, NY [Estados Unidos]) con anticuerpo de captura anti-INF- γ humano fueron incubadas durante toda la noche a 4 °C. La producción basal de INF- γ se determinó en suero y no en sobrenadante ya que el nivel de INF- γ en sobrenadante basal (a tiempo cero) es indetectable. Posteriormente se bloquearon con suero bovino fetal al 10% en *buffer* fosfato salino (PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubaron distintas diluciones de las muestras y del estándar durante 2 horas a temperatura ambiente. El INF- γ se detectó mediante 1 hora de incubación a temperatura ambiente, con el anticuerpo de detección biotinilado junto con avidina conjugada con peroxidasa de rábano picante, provisto por el kit. Se utilizó una solución comercial de tetrametilbencidina (TMB Reagent Set, BD [Estados Unidos]) como cromógeno, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Tras 30 minutos de incubación en oscuridad, se paró la reacción con H₂SO₄, y se midió la absorbancia. Los niveles de INF- γ se expresan en pg/ml.

Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se describen mediante la media y la desviación estándar. Las variables cualitativas se describen mediante el porcentaje de cada categoría. Dado el número de efectivos de los grupos de comparación se han utilizado pruebas no paramétricas en el análisis.

La comparación de la respuesta obtenida intragrupos de los niveles basales con los obtenidos tras estimulación, tanto en enfermos como en controles, se realizó mediante la prueba de Wilcoxon para datos pareados. Para la comparación intergrupos enfermos-controles se utilizó el test de Mann-Whitney. Se consideró significación estadística un valor de $p < 0,05$.

Por otra parte, se calculó si el porcentaje de enfermos no respondedores en cualquier nivel del eje IL-12/INF- γ era superior entre los enfermos respecto a los controles sanos mediante el test exacto de Fisher.

Se definió "ausencia de respuesta" a la estimulación con PHA y PPD en estos casos:

- Los niveles de INF- γ : aumentaban $< \times 4,5$ veces sobre el valor basal.
- El porcentaje de células con expresión de marcadores de IL-12R β 1 y de INF- γ R1 aumentaba $\leq 10\%$ sobre el valor basal.

Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia. Todos los enfermos y los controles aceptaron la inclusión en el estudio mediante consentimiento informado escrito.

Resultados

Se estudió a un total de 20 enfermos con TB y 21 controles sanos, de los cuales 15 de los enfermos con TB y 4 de los controles sanos eran varones. La edad media de los pacientes fue de $37,8 \pm 12,6$ años, frente a $26,2 \pm 10,4$ de los controles. Cuatro enfermos y 11 controles presentaban cicatriz indicativa de antecedentes de vacunación por BCG. De los 21 controles sanos, en 7 de ellos la PT fue positiva (PT+, mayor de 15 mm de induración), mientras que los otros 14 tenían PT negativa (PT-). Ninguno de ellos refería contacto epidemiológico conocido con pacientes tuberculosos.

1. Niveles de INF- γ

Se determinaron los niveles de INF- γ basal en muestras de suero, en enfermos y controles sanos, así como tras estimulación *in vitro*. En todos los grupos (fig. 2) se observó un incremento significativo de la producción de interferón tras estímulo con PPD y con PHA, indicativo de una respuesta conservada en la producción de INF- γ . Es importante destacar que el nivel de INF- γ basal (fig. 2 y tabla 1) fue significativamente mayor en enfermos que en controles ($p < 0,001$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles tras estimulación con PPD y PHA ($p = 0,42$ y $p = 0,97$, respectivamente). En los controles sanos, se observó un incremento significativo de la producción de interferón tras estímulo con PPD y con PHA, tanto en vacunados con BCG ($p = 0,008$ y $p = 0,003$, respectivamente) como en no vacunados ($p = 0,012$ y $p = 0,005$, respectivamente).

2. Expresión de receptores INF- γ R1 e IL-12R β 1

Se estudió la proporción de monocitos y linfocitos que expresaban INF- γ R1 e IL-12R β 1, respectivamente, en 14 enfermos de TB y en 18 controles sanos (4 con PT+ y 14 con PT-), tanto basalmente como tras estimulación con PPD y con PHA. En la figura 3A se muestra que los monocitos aumentaron la expresión del receptor para interferón tras estimulación tanto con

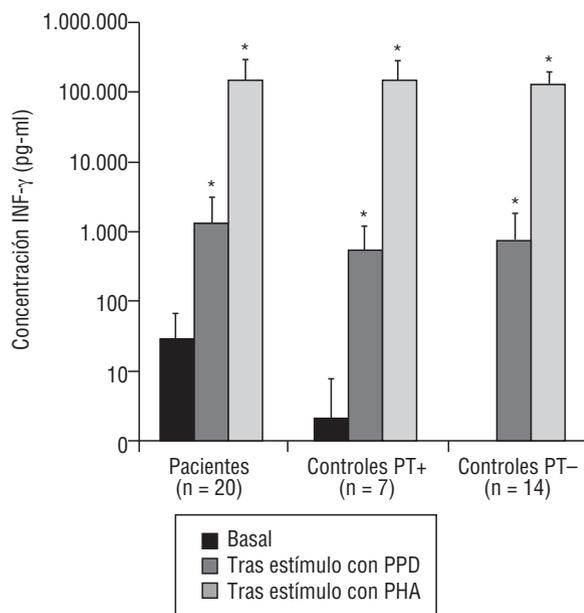


Figura 2 - Niveles de interferón gamma (INF- γ) basal y respuesta proliferativa a estímulos en pacientes con tuberculosis y controles sanos. PHA: fitohemaglutinina; PPD: derivado proteico purificado; PT+: prueba de la tuberculina positiva (≥ 15 mm); PT-: prueba de la tuberculina negativa (< 15 mm). * $p < 0,0001$ respecto al valor basal (prueba de Wilcoxon para datos pareados).

Tabla 1 - Niveles de interferón gamma (INF- γ) (pg/ml) en pacientes de tuberculosis y contactos sanos

	Basal	Tras estímulo PPD	Tras estímulo PHA
Enfermos	29 \pm 42	1.442 \pm 2.374	155.796 \pm 158.152
Sanos	0,8 \pm 3	671 \pm 1.090	140.927 \pm 93.391
Sanos PT+	2,5 \pm 6	540 \pm 739	157.385 \pm 129.990
Sanos PT-	0	727 \pm 1.232	132.698 \pm 73.489
p	< 0,001	0,42	0,64

p: nivel de significación de enfermos respecto a sanos (Prueba de Mann-Whitney); PHA: fitohemaglutinina; PPD: derivado proteico purificado; PT: prueba de la tuberculina. Resultados expresados como media \pm desviación estándar.

PPD y con PHA en todos los grupos, indicativo de una estimulación conservada de los receptores INF- γ R1 en cada grupo. El porcentaje de células que expresaban basalmente INF- γ R1 no fue distinto entre enfermos y controles sanos (tabla 2); sin embargo fue mayor en los pacientes tras estimulación con PPD y PHA ($p = 0,001$ y $p = 0,01$, respectivamente). En los controles sanos, los monocitos aumentaron la expresión del receptor de INF- γ R1 tras estímulo con PPD y PHA de forma significativa, tanto en vacunados con BCG ($p = 0,008$ en ambos), como en no vacunados ($p = 0,011$ y $p = 0,050$, respectivamente).

En el caso de la expresión del receptor IL-12R β 1 en linfocitos, se observó un incremento tras estimulación con PPD y con

PHA en todos los grupos (fig. 3B), lo que de nuevo indica una conservación adecuada de la función del IL-12R β 1. Es interesante indicar que el porcentaje de linfocitos que expresaron basalmente marcadores de IL-12R β 1 fue mayor en enfermos que en controles ($p = 0,03$) (tabla 2). Sin embargo, estas diferencias desaparecieron tras la estimulación de las células in vitro. En los controles sanos, los monocitos aumentaron la expresión del receptor tanto de IL-12R β 1 de forma significativa, tanto en vacunados con BCG, como en no vacunados ($p = 0,008$ frente a estimulación con PHA y PPD en ambos grupos).

3. Estudio de enfermos y controles no respondedores a PHA y PPD

Se analizó de forma individualizada a los pacientes no respondedores a los estímulos in vitro en presencia de PHA y PPD. Para ello, se comparó la proporción de pacientes que presentaban al menos una alteración en la respuesta frente a PHA o PPD con los controles sanos, en cualquiera de los tres niveles estudiados del eje IL-12/INF- γ .

En la tabla 3 se muestra a los pacientes no respondedores respecto al total de pacientes estudiados para cada determinación. En presencia de PHA, no respondieron en algún punto 2 pacientes, 1 control PT+ y 3 controles PT-, y no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos ($p = 0,14$). Se encontraron resultados semejantes tras la estimulación con PPD. No respondieron en algún punto 5 pacientes y 5 controles (todos ellos PT-), pero tampoco se observaron diferencias significativas ($p = 0,12$) entre el grupo de pacientes y el grupo de controles sanos.

Por último, se estudió conjuntamente la respuesta frente a PHA y a PPD. Para ello se incluyó únicamente a los pacientes en los que se pudo realizar todas las pruebas basales y en todos y cada uno de los tres niveles de respuesta proliferativa a todos los estímulos (PPD y PHA). Se observó que no respondieron al menos en algún punto 6 pacientes (6/12), un control PT+ (1/4) y 6 controles PT- (6/14). No se observaron diferencias significativas ($p = 0,68$), indicando nuevamente que la respuesta proliferativa entre el grupo de pacientes y de controles sanos es muy semejante. Por tanto, todos los resultados apuntan a que no se muestran claras alteraciones del eje IL-12/INF- γ en los pacientes gallegos enfermos de TB, comparados con los individuos sanos.

Discusión

M. tuberculosis es un patógeno capaz de evadir la respuesta inmunitaria, haciendo que ésta no sea enteramente efectiva para erradicar definitivamente la infección. En la respuesta inmunitaria frente a micobacterias, la integridad del eje IL-12/INF- γ es decisoria para que ésta sea efectiva¹⁸, por lo que nuestro grupo se planteó si la alta incidencia de TB en Galicia podría estar asociada a una alteración en la funcionalidad de esta vía.

Sin embargo, en el presente estudio no se observaron diferencias en la respuesta de los pacientes respecto al grupo control formado por personas no enfermas, tanto con PT+ como

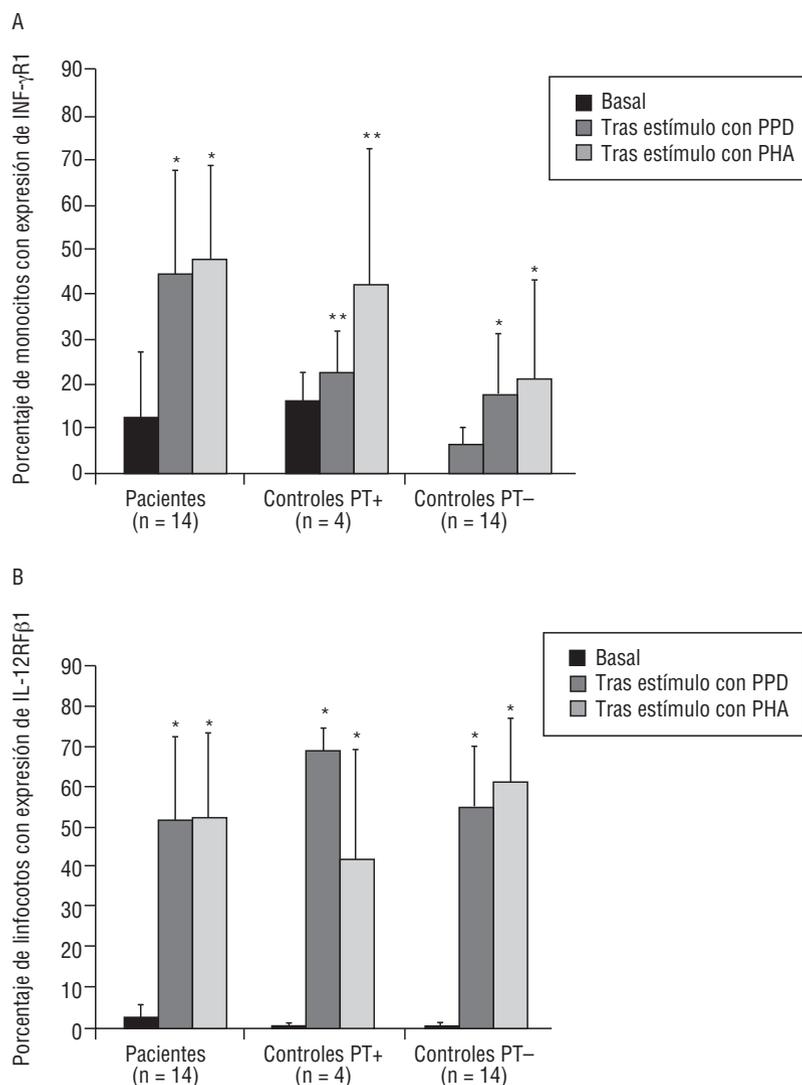


Figura 3 - Porcentaje de monocitos (A) y linfocitos (B) con expresión de los receptores para interferón gamma (INF- γ R1) e interleucina 12 (IL-12R β 1), respectivamente. Se han analizado tanto basalmente como tras activación con fitohemaglutinina (PHA) o derivado proteico purificado (PPD) en pacientes con tuberculosis y controles sanos con prueba de tuberculina (PT+) positiva (≥ 15 mm) o negativa (PT-).

*p < 0,0001 respecto al nivel basal.

**p < 0,03 respecto al nivel basal (prueba de Wilcoxon para datos pareados).

Tabla 2 - Expresión de los receptores INF- γ R1 e IL-12R β 1 en monocitos y linfocitos, respectivamente, en pacientes de tuberculosis y en controles sanos

	Expresión de receptores INF- γ R1 (porcentaje sobre monocitos totales)			Expresión de receptores IL-12R β 1 (porcentaje sobre linfocitos totales)		
	Basal	PPD	PHA	Basal	PPD	PHA
Enfermos	15,3 \pm 15,1	44,7 \pm 23,6	47,8 \pm 21,4	2,4 \pm 3,2	51,4 \pm 20,6	52,0 \pm 20,6
Sanos	8,3 \pm 5,3	18,8 \pm 12,8	25,8 \pm 24,7	0,5 \pm 0,6	58,0 \pm 14,6	56,7 \pm 19,7
Sanos PT+	14,1 \pm 6,9	22,5 \pm 9,7	42,0 \pm 31,0	0,6 \pm 0,6	68,2 \pm 6,2	42,3 \pm 26,5
Sanos PT-	6,6 \pm 3,6	17,8 \pm 13,7	21,2 \pm 21,8	0,5 \pm 0,6	55,1 \pm 15,2	60,9 \pm 16,3
p	0,400	0,001	0,010	0,030	0,700	0,610

p: nivel de significación de enfermos respecto a sanos (prueba de Mann-Whitney); PPD: derivado proteico purificado; PHA: fitohemaglutinina; PT: prueba de la tuberculina.

Resultados expresados como media \pm desviación estándar.

Tabla 3 - Proporción de pacientes no respondedores tras estímulo con PHA y PPD en 3 puntos del eje IL-12/INF- γ

	PHA			PPD		
	INF- γ	INF- γ R1	IL-12R β 1	INF- γ	INF- γ R1	IL-12R β 1
Enfermos	0/20	0/13	2/14	5/19	1/13	0/12
Controles PT positivos	0/6	0/4	1/4	0/6	0/4	0/4
Controles PT negativos	0/13	3/14	0/14	3/14	4/14	0/14
p		0,14			0,12	

IL-12: interleucina 12; INF- γ : interferón gamma; PPD: derivado proteico purificado; PHA: fitohemaglutinina; PT: prueba intradérmica de la tuberculina.

PT-, lo que hace suponer que la integridad del eje IL-12/INF- γ está conservada en los enfermos con TB. La respuesta está conservada en todos los niveles estudiados: la producción de INF- γ , y la expresión de receptores IL-12R β 1 e INF- γ R1, tanto a nivel basal como tras la estimulación con PHA y con PPD.

Hemos encontrado que los enfermos presentan niveles basales de INF- γ y expresión de IL-12R β 1 más elevados que los controles, lo que indicaría un estado de activación de su sistema inmunitario como consecuencia de la infección. Sin embargo, este estado de activación no les impide responder adecuadamente a estímulos in vitro, como son el PPD o la PHA, ya que no se encontraron diferencias entre los enfermos y controles después de la activación. Por el contrario, en el caso del INF- γ R1, mientras que los niveles basales fueron similares entre enfermos y controles, la expresión de este receptor fue mayor en los enfermos.

Al comparar nuestros resultados en la población gallega con otros estudios que analizan y comparan la producción de citocinas y su respuesta frente a estímulos en pacientes con TB y sanos, hemos observado la enorme controversia que hay entre distintos autores y estudios realizados. Así, en función del artículo analizado, los niveles basales de interferón y la respuesta frente a estímulos se ha encontrado en los enfermos: menor¹⁹⁻²¹, igual^{22,23} o incluso superior²⁴ a los controles. Estas diferencias pueden atribuirse al distinto protocolo utilizado en cada uno de los casos, e indica que una correcta estandarización de los estudios es deseable para poder comparar entre distintos ensayos.

Son bien conocidos distintos polimorfismos genéticos que resultan en incapacidad de una producción adecuada de INF- γ o en su funcionalidad²⁵. Los pacientes portadores de este tipo de alteración genética presentan infecciones graves por *M. tuberculosis* y otros patógenos intracelulares, habitualmente de gravedad extrema y en edades tempranas de la vida^{26,27}. Sin embargo, este tipo de alteraciones se ha logrado observar en un número muy limitado de pacientes, por lo que no justifican la alta tasa de prevalencia de TB en el mundo²⁸, ni tampoco en el caso concreto que nos ocupa en Galicia. Aún así, estos estudios han demostrado la importancia clave del eje IL-12/INF- γ , ya que la alteración cuantitativa o funcional en cualquier punto del eje se traduce en infecciones graves por patógenos intracelulares como las micobacterias.

Nuestro estudio está en concordancia con otros trabajos que demuestran que los individuos con enfermedad tuberculosa desarrollan aparentemente una respuesta inmunita-

ria adecuada, con producción conservada de INF- γ ^{29,30}. Estos autores encuentran una respuesta Th1 conservada en pacientes con TB frente a controles sanos o pacientes con infección latente. Kori et al¹⁵ estudiaron la respuesta Th1 en una población de inmigrantes etíopes en Israel, con alta prevalencia de enfermedad. Estudiaron la respuesta basal y proliferativa de INF- γ e IL-2. Al igual que en nuestro trabajo, encontraron una respuesta celular conservada en los enfermos con TB. Nuestro trabajo amplía el estudio de la respuesta del eje IL-12/INF- γ a otros niveles ya que se analizó la expresión de receptores IL-12R β 1 e INF- γ R1, encontrando también una respuesta conservada, indicativo de que la respuesta Th1 es efectiva. Otro estudio reciente evalúa la función Th1 observando los niveles de INF- γ , IL-2R e IL-12, tanto a nivel basal como tras la estimulación con PPD²⁴. Este estudio encuentra también una funcionalidad conservada de la respuesta Th1 en enfermos en comparación con grupos de control. Sin embargo, otros autores encuentran que la capacidad de respuesta frente al mitógeno PHA está reducida en enfermos de TB respecto a controles sanos³¹. No obstante, estos trabajos evalúan la respuesta en fases tempranas de enfermedad, ya que la menor producción de citocinas en la respuesta Th1 es reversible una vez iniciado el tratamiento antituberculoso.

El estudio presenta algunas limitaciones que merecen consideración. Si bien no hemos hallado diferencias significativas en la respuesta de los enfermos con TB respecto a los controles sanos, tanto a nivel de producción de INF- γ como en la expresión de los receptores IL-12R β 1 y INF- γ R1, respectivamente, no se puede excluir definitivamente que la alta incidencia de TB en Galicia pueda estar relacionada con disfunción del eje IL-12/INF- γ . Así, se ha descrito que *M. tuberculosis* puede bloquear a distintos niveles la respuesta macrófaga a INF- γ llevando a una deficiente eliminación de bacilo^{32,33}, y otros autores han indicado que la alteración en la respuesta inmunitaria puede deberse a una incapacidad de los macrófagos a responder adecuadamente a la producción de INF- γ frente al patógeno. De esta manera, el bacilo podría evadir los mecanismos de control inmunológico dependientes de INF- γ ³⁴.

La conservación de la respuesta cuantitativa del eje IL-12/INF- γ demostrada en nuestro trabajo abre las puertas para el estudio de otras posibles vías que podrían explicar una respuesta alterada no detectable con los análisis realizados en nuestro estudio. Entre ellas se han descrito innumerables posibilidades, como son alteraciones en las otras cadenas de

los receptores de IL-12 e INF- γ (IL-12 β 2, e INF- γ R2, respectivamente), o en los niveles en STAT1 (implicado en la señalización intracelular)³⁵⁻³⁷, alteración de linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺^{38,39}, de linfocitos Th2⁴⁰, de células CD8⁺ citotóxicas, o de células TCR γ δ ⁴¹. También se ha indicado que el eje IL-12/INF- γ exige la presencia de factores complementarios para ser enteramente efectivo en su acción, como son la 1 α ,25-dihidroxi-vitamina D3 y el TNF α ⁴¹ o incluso alteraciones en la transcripción de la vía NF κ B cinasa, IKK γ , IL-1R-associated kinasa (IRAK4)^{41,42}. Cualquier alteración de estos factores podría, al menos en teoría, ser la causa de una respuesta inmunitaria alterada.

Por otra parte, los prolongados tiempos de incubación de las muestras (7 días en el caso de PPD) han podido ser decisivos a la hora de obtener una respuesta tan alta a la estimulación, incluso en pacientes sanos sin BCG como en aquéllos con PT- (y por tanto indicativo de ausencia de infección por *M. tuberculosis*). Para solventar esta posible limitación, los períodos de incubación de pruebas diagnósticas basadas en liberación de citocinas se han reducido a tiempos menores de 24 horas por parte de algunos autores⁴³.

Concluimos que, aunque en nuestro estudio el eje IL-12/INF- γ no ha sido enteramente analizado, nuestros datos indican que la alta incidencia de enfermedad en Galicia no parece estar causada por una alteración del eje IL-12/INF- γ en la población enferma, a nivel de la respuesta cuantitativa de INF- γ , y expresión de IL-12R β 1 o INF- γ R1. El control de la enfermedad debe continuar basándose en los programas clásicos de prevención y control de la enfermedad.

Agradecimientos

Agradecemos especialmente al Dr. Francisco Gambón Deza y a Christian Sánchez Espinel del Servicio de Inmunología del Hospital Meixoeiro de Vigo su colaboración y soporte técnico en la realización de este trabajo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. A Global Emergency. WHO report on the tuberculosis epidemic. In: WHO/TB/. 1994;94:177.
2. Global tuberculosis control: WHO report 2010.
3. Guide S, Holland S. Host susceptibility factors in mycobacterial infection. Genetics and body morphotype. *Infect Dis Clin North Am.* 2002;16:163-86.
4. Robinson C, Nau G. Interleukin-12 and interleukin-27 regulate macrophage control of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 2008;198:359-66.
5. Dorman S, Picard C, Lammas D, Heyne K, van Dissel JT, Baretto R, et al. Clinical features of dominant and recessive interferon gamma receptor 1 deficiencies. *Lancet.* 2004;364:2113-21.
6. Flynn J, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:93-129.
7. Lin P, Flynn J. Understanding latent tuberculosis: a moving target. *J Immunol.* 2010;185:15-22.
8. Garibay-Escobar A, Estrada-García I, Estrada-Parra S, Santos-Argumedo L. Integrated measurements by flow cytometry of the cytokines IL-2, IFN-gamma, IL-12, TNF-alpha and functional evaluation of their receptors in human blood. *J Immunol Methods.* 2003;280:73-88.
9. Anibarro García L, Vázquez-Gallardo R, Toubes Navarro M, Penas Truque A, Lema Mougán R, Túniz Bastida V, et al. Epidemiología de la tuberculosis en Galicia. *An Med Intern.* 1999;16:290-6.
10. Cruz-Ferro E, Fernández-Nogueira E. Epidemiology of tuberculosis in Galicia, Spain, 1996-2005. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007;11:1073-9.
11. Stead W, Senner J, Reddick W, Lofgren J. Racial differences in susceptibility to infection by *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med.* 1990;322:422-7.
12. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam K, Whittle H, Hill A. Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med.* 1998;338:640-4.
13. Fitness J, Floyd S, Warndorff D, Sichali L, Malema S, Crampin AC, et al. Large-scale candidate gene study of tuberculosis susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71:341-9.
14. Möller M, De Wit E, Hoal E. Past, present and future directions in human genetic susceptibility to tuberculosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010;58:3-26.
15. Kori M, Barak V, Leibovitz E, Altman Y, Eliraz A, Handzel Z. Specific in vitro proliferative immune responses and lymphokine production in Ethiopian children with and without tuberculosis. *Infection.* 2000;28:42-5.
16. Ruiz-Manzano J, Blanquer R, Calpe JL, Caminero JA, Caylà J, Domínguez JA, et al. Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis. *Arch Bronconeumol.* 2008;44:551-66.
17. Interpretación de la Prueba de Tuberculina. In: Xunta de Galicia CdS, ed. *Infección tuberculosa y estudio de contactos.* Santiago de Compostela; 2009. p. 23-4.
18. Saunders B, Britton W. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol.* 2007;85:103-11.
19. Zhang M, Lin Y, Iyer D, Gong J, Abrams J, Barnes P. T-cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1995;63:3231-4.
20. Torres M, Herrera T, Villareal H, Rich E, Sada E. Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1998;66:176-80.
21. Hirsch C, Toossi Z, Othieno C, Johnson JL, Schwander SK, Robertson S, et al. Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. *J Infect Dis.* 1999;180:2069-73.
22. Antas P, Cardoso F, Pereira K, Franken KL, Cunha KS, Klatser P, et al. T cell immune responses to mycobacterial antigens in Brazilian tuberculosis patients and controls. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005;99:699-707.
23. Aktas E, Ciftci F, Bilgic S, Sezer O, Bozkanat E, Deniz O, et al. Peripheral immune response in pulmonary tuberculosis. *Scand J Immunol.* 2009;70:300-8.
24. Handzel Z, Barak V, Altman Y, Bibi H, Lidgi M, Iancovici-Kidon M, et al. Increased Th1 and Th2 type cytokine production in patients with active tuberculosis. *Isr Med Assoc J.* 2007;9:479-83.
25. Casanova J, Abel L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:55-66.

26. Cooke G, Campbell S, Sillah J, Gustafson P, Bah B, Sirugo G, et al. Polymorphism within the interferon-gamma/receptor complex is associated with pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174:339-43.
27. Pedraza-Sánchez S, Herrera-Barrios M, Aldana-Vergara R, Neumann-Ordoñez M, González-Hernández Y, Sada-Díaz E, et al. Bacille Calmette-Guérin infection and disease with fatal outcome associated with a point mutation in the interleukin-12/interleukin-23 receptor beta-1 chain in two Mexican families. *Int J Infect Dis.* 2010;14(Suppl 3):e256-60.
28. Filipe-Santos O, Bustamante J, Chappier A, Vogt G, de Beaucoudrey L, Feinberg J, et al. Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol.* 2006;18:347-61.
29. Lai C, Ho S, Chan C, Chan J, Choy D, Leung R, et al. Cytokine gene expression profile of circulating CD4+ T cells in active pulmonary tuberculosis. *Chest.* 1997;111:606-11.
30. Schwander S, Torres M, Sada E, Carranza C, Ramos E, Tary-Lehmann M, et al. Enhanced responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens by human alveolar lymphocytes during active pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis.* 1998;178:1434-45.
31. Sahiratmadja E, Alisjahbana B, De Boer T, Adnan I, Maya A, Danusantoso H, et al. Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokine profiles and gamma interferon receptor signaling integrity correlate with tuberculosis disease activity and response to curative treatment. *Infect Immun.* 2007;75:820-9.
32. Jung Y, LaCourse R, Ryan L, North R. Virulent but not avirulent *Mycobacterium tuberculosis* can evade the growth inhibitory action of a T helper 1-dependent, nitric oxide Synthase 2-independent defense in mice. *J Exp Med.* 2002;196:991-8.
33. Singhal A, Jaiswal A, Arora V, Prasad H. Modulation of gamma interferon receptor 1 by *Mycobacterium tuberculosis*: a potential immune response evasive mechanism. *Infect Immun.* 2007;75:2500-10.
34. Banaiee N, Kincaid E, Buchwald U, Jacobs WJ, Ernst J. Potent inhibition of macrophage responses to IFN-gamma by live virulent *Mycobacterium tuberculosis* is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2. *J Immunol.* 2006;176:3019-27.
35. Sahiratmadja E, Alisjahbana B, Buccheri S, Di Liberto D, De Boer T, Adnan I, et al. Plasma granulysin levels and cellular interferon-gamma production correlate with curative host responses in tuberculosis, while plasma interferon-gamma levels correlate with tuberculosis disease activity in adults. *Tuberculosis (Edinb).* 2007;87:312-21.
36. Chappier A, Kong X, Boisson-Dupuis S, Jouanguy E, Averbuch D, Feinberg J, et al. A partial form of recessive STAT1 deficiency in humans. *J Clin Invest.* 2009;119:1502-14.
37. Kong XF, Ciancanelli M, Al-Hajjar S, Alsina L, Zumwalt T, Bustamante J, et al. A novel form of human STAT1 deficiency impairing early but not late responses to interferons. *Blood.* 2010;116:5895-906.
38. Chen X, Zhou B, Li M, Deng Q, Wu X, Le X, et al. CD4(+)CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells suppress *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients with active disease. *Clin Immunol.* 2007;123:50-9.
39. He X, Xiao L, Chen H, Hao J, Li J, Wang YJ, et al. T regulatory cells and Th1/Th2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;29:643-50.
40. Hougardy J, Place S, Hildebrand M, Drowart A, Debie AS, Loch C, et al. Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176:409-16.
41. Van de Vosse E, Hoeve M, Ottenhoff T. Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect Dis.* 2004;4:739-49.
42. Sallakci N, Coskun M, Berber Z, Gürkan F, Kocamaz H, Uysal G, et al. Interferon-gamma gene + 874T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. *Tuberculosis (Edinb).* 2007;87:225-30.
43. Leyten EM, Arend SM, Prins C, Cobelens FG, Ottenhoff TH, Van Dissel JT. Discrepancy between *Mycobacterium tuberculosis*-specific gamma interferon release assays using short and prolonged in vitro incubation. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14:880-5.