

Perfil Transcriptómico en Linfocitos T CD4+ de Pacientes con Tuberculosis Latente y Activa

Transcriptomic Profile in CD4 + T Lymphocytes of Patients with Latent and Active Tuberculosis

Tomas Raul Wiche Salinas, Ignacio Valencia Mercado, Jose Alonso Suclla Velasquez, Luis Acosta Vega
Universidad Católica de Santa María. Arequipa Perú.

INFORMACIÓN

Historia del Artículo

Recepción: 13/03/2019

Revisión: 10/05/2019

Aceptación: 22/05/2019

Palabras Clave

Tuberculosis, expresión génica, citoquinas.

Key Words

Tuberculosis, gene expression, cytokines.

DOI

<https://doi.org/10.35286/veritas.v20i1.230>

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa de suma importancia en salud pública y de extensión mundial: cada año hay un estimado de 8,7 millones de nuevos casos en el mundo, causando 1,4 millones de muertes. El presente estudio busca evaluar y comparar la expresión génica de los linfocitos T CD4+ de individuos con tuberculosis latente y activa de la ciudad de Arequipa. Fueros aislados por selección negativa linfocitos T CD4+ utilizando beads magnéticos de 10 pacientes con tuberculosis latente y 20 con tuberculosis activa. Se evaluó la expresión génica de las citoquinas pro-inflamatorias IFN-gamma, IL-17, IL-8 e IL-6 y de la citoquina anti inflamatoria IL-4 y el factor de transcripción FOXP3 por RT PCR. El presente estudio encontró que una mayor expresión génica de IFN-gamma, IL-6, IL-8 e IL-17 están asociados a tuberculosis latente mientras que una mayor expresión de IL-4 y FOXP3 están asociados a tuberculosis activa. Entendiendo los mecanismos inmunológicos asociados a tuberculosis latente y activa nos permitirá comprender su patogénesis.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease cause of a major public health problem worldwide. Every year there are 8.7 million new cases and 1.4 million deads. The present study evaluated and compared the gen expression of CD4+ T cells of latent and active Tuberculosis-infected individuals in the city of Arequipa. CD4+ T cells were isolated by negative selection using magnetic beads from 10 patients with latent and 20 with active tuberculosis. Gen expression of pro-inflammatory cytokines IFN-gamma, IL-17, IL-8 and IL-6, and anti-inflammatory cytokine IL-4 and transcription factor FOXP3 were evaluated by RT-PCR. The present study found a higher expression of IFN-gamma, IL-6, IL-8, and IL-17 in active tuberculosis and a higher expression of IL-4 and FOXP3 in active tuberculosis. Understanding the immunological mechanism associated with latent and active tuberculosis will let us understand its pathogenesis.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa de suma importancia en salud pública y de extensión mundial: cada año hay un estimado de 8,7 millones de nuevos casos en el mundo, causando 1,4 millones de muertes. En Perú para el 2011 se reportaron 31 241 nuevos casos, ocasionando una mortalidad de 7,4 por 100 000 habitantes (1).

La infección por *Mycobacterium Tuberculosis* puede ser controlada en la mayoría de individuos a partir de una respuesta inmune celular, estos individuos permanecen asintomáticos sin desarrollar enfermedad, esta condición es conocida como tuberculosis latente, sin embargo, en una pequeña proporción de individuos la respuesta inmune desarrollada no es suficiente y los individuos desarrollan la enfermedad llamándose esta condición tuberculosis activa (2). Ello claramente implica que existen diferencias entre los procesos celulares que se producen en individuos con la infección latente y aquellos correspondientes a sujetos con la forma activa de la enfermedad.

Estudios previos han demostrado que existe una respuesta inmune diferente entre individuos con tuberculosis activa y aquellos con la infección latente (4).

La respuesta inmune de los linfocitos T CD4+ contra *Mycobacterium Tuberculosis* no ha sido totalmente elucidada (3). No se conoce en detalle la expresión génica de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias de los linfocitos T CD4+ de individuos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* que desarrollaron tuberculosis latente o activa.

El presente estudio busca evaluar y comparar la expresión génica de los linfocitos T CD4+ de individuos con tuberculosis latente y activa de la ciudad de Arequipa

MATERIAL Y MÉTODOS

Individuos de estudio y criterios de selección

Se incluyeron en el estudio primeramente 100 pacientes asintomáticos sin historia previa de tuberculosis activa que asistieron a centros de salud de distritos de la ciudad de Arequipa altamente endémicos para tuberculosis. A estos pacientes se les realizó el test de interferón gama por Elispot específico para *Mycobacterium tuberculosis* para poder identificar aquellos con tuberculosis latente. Se consideraron individuos con tuberculosis latente aquellos que tuvieron una reacción positiva para el test de gama interferón. Se seleccionaron los 10 pacientes con mayor producción de

Correspondencia:
Tomas Raul Wiche Salinas
tomaswiche@hotmail.com

gamma interferón para los estudios de expresión génica.

Paralelamente se seleccionaron 20 pacientes diagnosticados con tuberculosis activa incluidos en el programa de tratamiento para tuberculosis del Ministerio de Salud. Los participantes se encontraban recibiendo tratamiento con fármacos antituberculosos. Los participantes seleccionados fueron negativos para VIH.

ELISPOT de gamma interferón

Se realizó el test de interferon gama específico para *Mycobacterium tuberculosis* en 100 pacientes sanos. Se utilizó el kit quantiferon-TB siguiendo los protocolos del proveedor (Qiagen). Se seleccionaron 10 pacientes con la producción más alta de gamma interferón. De ser negativo el test se excluyeron los pacientes del estudio.

Extracción de RNA

Se obtuvieron muestras sanguíneas de los pacientes seleccionados y se procedió al aislamiento de células mononucleares mediante la técnica de gradiente de sedimentación utilizando Ficoll Histopaque (Sigma). Las células mononucleares de sangre periférica obtenidas fueron sometidas a un proceso de selección negativa para purificar linfocitos T CD4. Para el proceso de selección negativa se utilizó el kit de aislamiento para linfocitos T CD4 por medio de beads magnéticos (MACS, Miltenyi Biotec).

Posterior a ello se extrajo ARN mensajero de las células T CD4 aisladas mediante el uso del kit RNAeasy plus siguiendo las instrucciones del proveedor (Qiagen, Valencia CA). Se determinó la integridad del producto extraído por electroforesis y su pureza por espectrofotometría.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Una vez extraído el ARN mensajero se procedió realizar la transcripción reversa a cDNA. Se utilizó el kit SuperScript III Reverse Transcriptase (ThermoFisher) siguiendo las instrucciones del proveedor. Para la preparación de la PCR se utilizó el kit Platinum PCR Supermix (ThermoFisher) La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en el termociclador Mastercycler pro (Eppendorf). Se evaluó la expresión génica de las siguientes citoquinas proinflamatorias: INF gamma, IL-17, IL-8, IL-6, IL-4, foxp3 y como genes house keeping, la beta actina y GADPH. La secuencia de los primers fue la siguiente: INF gamma R: 5' - tag ctg ctg gcg aca gtt ca-3'; F: 5' - aaa aat aat gca gag cca aat tg -3'; FOX3 3 R: 5' -ggg gtg ggt gag gag cac at-3'; F: 5' - cga gtg aca agc ctg tag c-3'; IL-17 R: 5' - aga ttg agt cgg aaa tga ggc tg 3'; F: 5' - tca acc cga ttg tcc acc at- 3'; IL8 : 5' - ttg gca gcc ttc ctg att tc -3' F: 5' - aac ttc tcc aca acc ctg tg -3'; primers 5' aatgccagcctgctgacgaac and 5'acaacaatctgaggtgccatgctac. Para el análisis de la cuantificación comparativa del PCR en tiempo real se usó el método delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$)

RESULTADOS

Niveles de interferón gama producidos por individuos con tuberculosis latente

De los 100 individuos asintomáticos incluidos en el presente estudio, se encontró que el 69% de individuos presentaba tuberculosis latente. En estos 69 pacientes se categorizo la producción de gamma interferón en niveles altos y bajos de producción. El 41 % del total de individuos incluidos tuvo una producción alta de gamma-interferón mientras que el 28% una producción baja (Tabla1).

Tabla 1: Producción de gamma interferón en individuos con tuberculosis latente

Producción de gamma interferón	Negativo	Baja	Alta
Número de individuos n=100	31	28	41

Mayor expresión génica de IL-17, IL-6, IL-8 e IFN-gamma en linfocitos T CD4+ de pacientes con tuberculosis Latente

Fueron aislados por selección negativa linfocitos T CD4+ utilizando beads magnéticos de 10 pacientes con tuberculosis latente y 20 con tuberculosis activa. Se evaluó la expresión génica de las citoquinas pro-inflamatorias IL-17, IL-6, IL-8 e IFN gamma por RT-PCR. Se encontró que los pacientes con tuberculosis latente tienen mayores niveles de expresión génica de las citoquinas pro-inflamatorias IL-17, IL-6, IL-8 e IFN gamma. Mayores niveles de expresión de estas citoquinas por parte de los linfocitos T CD4+ fue observada en los individuos con tuberculosis latente comparado con los de tuberculosis activa. Muy probablemente estos niveles más altos de expresión ayuden a controlar la infección en estos individuos teniendo un efecto benéfico (Figura 1.).

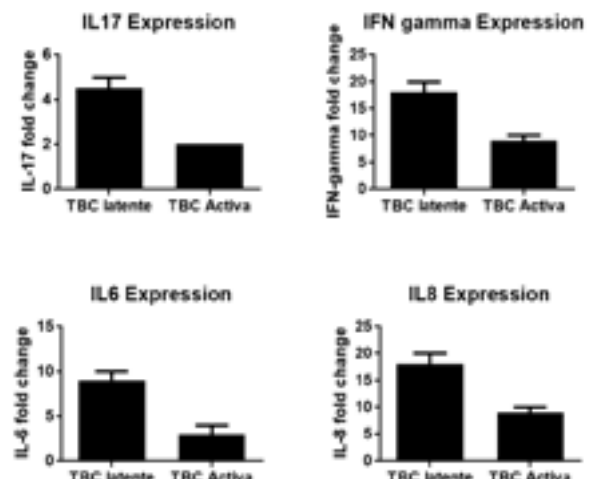


Fig. 1: Expresión génica de citoquinas pro-inflamatorias en pacientes con tuberculosis latente vs tuberculosis activa

Mayor expresión génica de FOXP3 e IL-4 en pacientes con Tuberculosis Activa

Fueron aislados por selección negativa linfocitos T CD4+ utilizando beads magnéticos de 10 pacientes con tuberculosis latente y 20 con tuberculosis activa. Se evaluó la expresión génica de la citoquina anti-inflamatoria IL-4 y el factor de transcripción FOXP3 por RT-PCR. Se encontró que los pacientes con tuberculosis latente tienen menores niveles de expresión génica de la citoquina IL-4 y el factor de transcripción FOXP3. Muy probablemente la menor expresión génica de IL-4 y FOXP3 sean favorables en estos individuos con tuberculosis latente en el control de la infección (Figura 2).

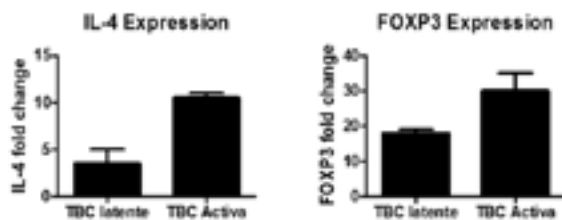


Fig. 2: Expresión génica de citoquina anti inflamatoria IL-4 y el factor de transcripción FOXP3

DISCUSIÓN

Mycobacterium Tuberculosis está ampliamente diseminado por el mundo, sin embargo no todas las personas desarrollan la enfermedad activa, las razones de este fenómeno recién se están estudiando a la luz de la tecnología actual.

La respuesta inmune ante el *Mycobacterium Tuberculosis* está influenciada por la variabilidad genética, esto convierte a la tuberculosis en una enfermedad compleja y de difícil estudio.

La respuesta Th1 asociada a la producción de citoquinas pro inflamatorias es la más importante para controlar la infección por este bacilo, sin embargo no es la única involucrada (5).

En el presente estudio encontramos que los pacientes con tuberculosis latente presentan una mayor expresión génica de IL-6, IFN gamma, IL-8 e IL-17 y una menor expresión génica de IL-4 y FOXP3. Esta mayor expresión de citoquinas proinflamatorias en los linfocitos T CD4 de pacientes con tuberculosis latente sea muy probablemente un factor determinante para que estos individuos controlen la infección por *Mycobacterium Tuberculosis* y no desarrollen una infección activa. Las citoquinas pro-inflamatorias IFN gama e IL-6 son secretadas principalmente por linfocitos Th1. Nuestros resultados corroboran estudios anteriores en los cuales se demostró que este tipo de respuesta está asociado a un control de la infección.

En nuestro estudio también encontramos que los pacientes con tuberculosis activa tuvieron una mayor expresión de la citoquina anti-inflamatoria IL-4 y el factor de transcripción FOXP3. La citoquina IL-4 es principalmente producida por los linfocitos Th2 los cuales no son capaces de controlar infecciones intracelulares. Al ser *Mycobacterium*

Tuberculosis una infección intracelular individuos que tengan una respuesta Th2 no serán capaces de controlar la infección. Paralelamente también se encontró que los linfocitos T CD4 de individuos con tuberculosis activa tenían una mayor expresión del factor de transcripción FOXP3. FOXP3 es un factor de transcripción expresado por las células T regulatorias. Estas células han sido asociadas a un pronóstico desfavorable en los pacientes con tuberculosis activa y muy probablemente también su sobre expresión sea un factor deletéreo para controlar la infección.

CONCLUSIONES

En conclusión, el presente estudio encontró que una mayor expresión génica de IFN-gamma, IL-6, IL-8 e IL-17 están asociados a tuberculosis latente mientras que una mayor expresión de IL-4 y FOXP3 están asociados a tuberculosis activa.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María por el financiamiento del presente proyecto y a todos los participantes del mismo. Se agradece la iniciativa y conducción del proyecto de investigación al Dr. Luis Acosta Vega lamentando su sensible fallecimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2012 [Internet]. 2012 [citado 28 de junio de 2013]. Recuperado a partir de: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf
2. Kaufmann SHE, McMichael AJ. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat. Med.* abril de 2005;11(4 Suppl):S33-44.
3. Green AM, Difazio R, Flynn JL. IFN- γ from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 1 de enero de 2013;190(1):270-7.
4. Liu K, Zhang Y, Hu S, Yu Y, Yang Q, Jin D, et al. Increased levels of BAFF and APRIL related to human active pulmonary tuberculosis. *Plos One.* 2012;7(6):e38429.
5. Kozakiewicz L, Phuah J, Flynn J, Chan J. The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013;783:225-50.
6. Bold TD, Ernst JD. CD4+ T cell-dependent IFN- γ production by CD8+ effector T cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 1 de septiembre de 2012;189(5):2530-6.
7. Yang B, Wang X, Jiang J, Cheng X. Involvement of CD244 in regulating CD4+ T cell immunity in patients with active tuberculosis. *Plos One.* 2013;8(4):e63261.