

Estudio comparativo de los niveles de receptor soluble de interleucina 2 y adenosín-desaminasa en líquidos pleurales tuberculosos y de otras etiologías

M.J. Avilés Inglés, C. Contessotto, J. Ontañón*, M. Muro*, P. Berlinches**, J. de la Torre**, F. Sánchez Gascón*** y M.R. Álvarez López*

Sección de Neumología. Hospital Los Arcos. Santiago de la Ribera. Murcia. *Hospital Santa María del Rosell. Cartagena. ***Hospital General de Murcia. **Sección de Inmunología. Hospital Virgen de la Arrixaca. Murcia.

En el marco de las investigaciones básicas dirigidas a esclarecer los mecanismos inmunológicos que configuran la respuesta del huésped frente a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*, se han valorado los niveles de receptor soluble de interleucina 2 (sIL-2R) en exudados pleurales tuberculosos, en comparación con líquidos de etiología no micobacteriana.

Para ello, se han estudiado 40 enfermos con derrame pleural: 10 con pleuresía tuberculosa, 10 con neoplasia, 10 con neumonía bacteriana no tuberculosa y 10 con trasudado. La determinación de la concentración de sIL-2R se efectuó mediante técnica ELISA.

En pacientes con tuberculosis, el valor de sIL-2R en líquido pleural fue 14.666 ± 5.634 U/ml, significativamente superior a los niveles encontrados en cualquier otro grupo de patología, que fueron 4.341 ± 2.655 U/ml en los derrames neumónicos, 5.542 ± 3.682 U/ml en los neoplásicos y 1.377 ± 125 U/ml en los trasudados ($p < 0,001$). Asimismo, se demostró una excelente correlación entre los niveles de adenosín-desaminasa (ADA) y de sIL-2R en el líquido pleural de los enfermos con tuberculosis ($p < 0,001$ y $r = 0,805$).

En la tuberculosis pleuropulmonar, la compartimentalización de la respuesta inmune de la cavidad pleural determina la existencia de niveles significativamente más elevados de sIL-2R con respecto a los detectados en los líquidos pleurales de otra etiología. Esta observación, así como la demostración de una estrecha correlación entre sIL-2R y ADA, permite plantear la posible utilización de esta molécula como un parámetro accesorio en el diagnóstico diferencial de los derrames pleurales, aunque en este estudio no parece alcanzar el grado de fiabilidad de la ADA.

Palabras clave: Derrame pleural tuberculoso. Receptor soluble de interleucina 2. Adenosín-desaminasa. Inmunología de la tuberculosis. Derrame pleural.

Arch Bronconeumol 1996; 32: 523-526

Este estudio forma parte de un proyecto subvencionado parcialmente por la Fundación Española de Patología Respiratoria, mediante Beca SEPAR 1994 de Ayuda para Iniciación a la Investigación.

Correspondencia: Dra. M.J. Avilés Inglés, Servicio de Neumología, Hospital Los Arcos, Pasco de Colón, 54, 30720 Santiago de la Ribera. Murcia.

Recibido: 30-1-96; aceptado para su publicación: 7-5-96.

Comparative assessment of soluble interleukin 2 receptor and adenosin-desaminase levels in pleural fluid of patients with tuberculosis or other diseases

In order to better understand the immunological mechanisms involved in host protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection, we studied soluble interleukin 2 receptor (sIL-2R) concentration in tuberculous pleural exudates as well as in pleural fluids of non-mycobacterial etiology.

We collected pleural fluid from 40 patients: 10 with tuberculous pleurisy, 10 with neoplasia, 10 with non-tuberculous bacterial pneumonia and 10 with trasudate. Soluble IL-2R was measured in the stored specimens using a standard ELISA technique.

In patients with tuberculosis, sIL-2R in pleural fluid was $14,666 \pm 5,634$ U/ml, significantly higher than was detected in any other group, being $4,341 \pm 2,655$ U/ml in pneumonic exudates, $5,542 \pm 3,682$ U/ml in neoplastic exudates and $1,377 \pm 125$ in trasudates ($p < 0.001$). Also, an excellent correlation was demonstrated between adenosin-desaminase (ADA) and sIL-2R in tuberculous pleural fluids, with $p < 0.001$ and $r = 0,805$.

In pleuropulmonary tuberculosis, compartmentalization of the immune response in the pleural space is responsible for the significantly higher levels of sIL-2R that were found in tuberculous pleural liquids compared with the ones detected in other diseases. This observation, as well as the demonstration of a good correlation between sIL-2R and ADA, suggest the possible usefulness of this molecule as an additional marker in the differential diagnosis of pleural effusions, though in the present study it appears to be less reliable than ADA.

Key words: Tuberculous pleural exudate. Soluble receptor of interleukin 2. Adenosin-desaminase. Immunology in tuberculosis. Pleural effusions.

Introducción

Para el desarrollo de estrategias diagnosticoterapéuticas eficaces en la lucha contra la tuberculosis, es necesario un conocimiento profundo de los complejos mecanismos inmunológicos involucrados en la defensa del

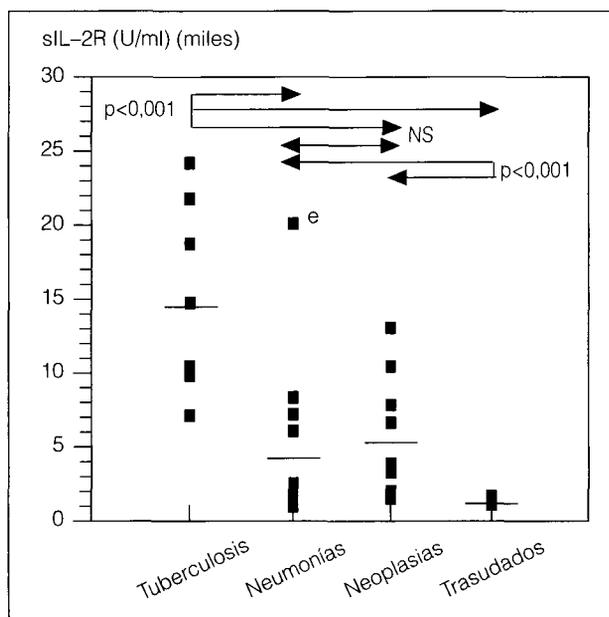


Fig. 1. Valores de receptor soluble de interleucina 2 (sIL-2R) en el líquido pleural en los distintos grupos de patología pulmonar. e: empiema; no incluido en el análisis estadístico.

huésped contra la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Estudios anteriores han demostrado que la concentración del factor soluble de la interleucina 2 (IL-2) en diferentes líquidos biológicos es proporcional al grado y a la duración de la estimulación que reciben los linfocitos T del huésped^{1,2}. La presentación de los antígenos micobacterianos a las células T induce la producción de IL-2 que, a su vez, promueve la expresión de su propio receptor de membrana³. Éste está formado por tres cadenas polipeptídicas, denominadas *alfa* (p55), *beta* (p70) y *gamma* (p64)^{4,5}, y su unión con la IL-2 lleva a la proliferación clonal, maduración y diferenciación de linfocitos T competentes^{6,7}. Una fracción soluble de 45 kD, liberada por rotura proteolítica de la subunidad *alfa*, es hoy día fácilmente detectable en los distintos líquidos orgánicos mediante anticuerpos monoclonales y es el objeto del presente estudio.

Elevaciones importantes del nivel de receptor soluble a la IL-2 (sIL-2R) han sido evidenciadas en el suero de pacientes con una amplia gama de enfermedades, siendo por tanto un dato bastante inespecífico, que refleja la intensidad de la activación de las células T con independencia de la situación en que ésta se produce¹. Sin embargo, recientemente se ha descrito que en enfermos con tuberculosis pleuropulmonar existe una mayor concentración de sIL-2R en el líquido pleural que en la sangre, y que estos niveles son más elevados que en exudados pleurales de pacientes afectados de otras patologías^{8,9}.

La finalidad de nuestro trabajo fue buscar una posible aplicación clínica de esta molécula para el diagnóstico diferencial de los derrames pleurales, comparando su utilidad con respecto a la determinación de la actividad de la adenosín-desaminasa (ADA).

Pacientes y métodos

Selección de pacientes

Se estudiaron 40 pacientes con derrame pleural, consecutivamente, para cada tipo de patología, incluidos en 4 grupos de 10 sujetos cada uno: a) tuberculosis pulmonar confirmada microbiológicamente; b) neoplasia pulmonar primaria (5 adenocarcinomas, 3 carcinomas epidermoides y 2 carcinomas *oats cell*); c) neumonía bacteriana (9 derrames paraneumónicos no complicados y un empiema), y d) trasudado (8 cardiogénicos, un síndrome nefrótico y una cirrosis hepática).

Recogida y preparación de muestras

A todos los pacientes se les efectuó toracocentesis, según la técnica habitual. Una parte del líquido extraído se remitió al laboratorio para los estudios bioquímico, citométrico y microbiológico, otra se envió al servicio de anatomía patológica para su análisis citológico y una tercera parte se conservó, tras centrifugación, para separar la fracción celular, alicuotándose y congelándose de inmediato a -30°C , hasta su uso para la determinación de la molécula objeto de la presente investigación. Asimismo, se extrajeron 10 ml de sangre periférica en un tubo de vidrio y, tras incubar 30 min a 37°C para la retracción del coágulo, se centrifugó y almacenó en las mismas condiciones que los líquidos pleurales.

Determinación de sIL-2R

El análisis cuantitativo de sIL-2R se realizó mediante una técnica de inmunoanálisis marcada por enzimas (ELISA), disponible comercialmente con la denominación de Cellfree[®], de la Compañía T Cell Sciences de Cambridge, Massachusetts, EE.UU. En resumen, el estándar o las muestras problema se introducen en unos pocillos de poliestireno para microtitulaciones, previamente recubiertos con un anticuerpo monoclonal murino anti-IL-2R humano. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 3 h, se añade un segundo anticuerpo monoclonal murino anti-IL-2R humano unido a una peroxidasa de rábano. En estas condiciones el sIL-2R presente en la muestra se fija al anticuerpo absorbido en la superficie del pocillo, mientras que el anticuerpo conjugado se une a un segundo epítipo diferente de la molécula en estudio, completándose así el sándwich. Tras un nuevo período de incubación de 2 h, el antígeno libre se elimina por lavado mediante una solución tamponada a pH 7,4 y se añade un cromógeno a base de O-fenilendiamina, dejándolo en contacto con la muestra durante 20 min. La reacción se interrumpe añadiendo una solución de SO_4H_2 2N, obteniéndose un producto terminal cuya densidad óptica leída a 490 nm es proporcional a la cantidad de sIL-2R presente.

Mediante 6 concentraciones estándar de sIL-2R se elaboró una curva patrón, a partir de la cual los valores de las muestras problema posteriormente se determinaron por duplicado en cada caso.

Determinación de ADA

Para la estimación de la actividad de la enzima ADA se empleó el método propuesto por Blake y Berman, adaptado por Boehringer Mannheim. Se trata de un test cinético rápido, en el cual el amoníaco liberado de la adenosina en la reacción de glutamato deshidrogenasa se une al 2-cetoglutarato, con la oxidación paralela de NADPH a NADP. La disminución de la absorbancia a 320 nm permite una valoración de la linealidad de la reacción y, mediante una fórmula matemática, el cálculo de la actividad en unidades internacionales por litro.

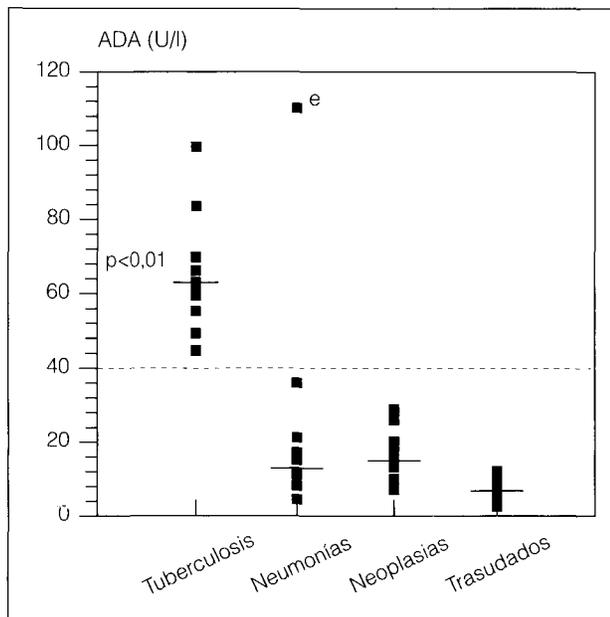


Fig. 2. Valores de adenosín-desaminasa (ADA) en el líquido pleural en los 4 grupos de patología estudiados. e: empiema; no incluido en el análisis estadístico.

Estudio estadístico

El tratamiento estadístico inferencial de los datos se realizó mediante estudio de regresión-correlación para variables cuantitativas y, para la comparación entre grupos, mediante el test de la t de Student o análisis de variancia de una vía, según fuera apropiado, complementándolo con contraste de igualdad de pares de medias.

Resultados

Los niveles de sIL-2R en el líquido pleural en los diferentes grupos de enfermos estudiados se muestran en la figura 1. El valor de esta molécula fue 14.666 ± 5.634 U/ml en los pacientes con tuberculosis, 4.341 ± 2.655 U/ml en las neumonías, 5.542 ± 3.682 U/ml en las neoplasias y 1.377 ± 125 U/ml en los trasudados. Hay que destacar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en las cifras detectadas en los pacientes tuberculosos con respecto al resto de las patologías.

Los valores de actividad de la enzima ADA en el líquido pleural de estos mismos pacientes fueron de $65,5 \pm 14,5$ U/l en los casos de tuberculosis, siendo significativamente más elevados que en los restantes grupos: $15 \pm 9,1$ U/l en neumonías, $15,8 \pm 6,6$ U/l en neoplasias y $6,4 \pm 4$ U/l en trasudados (fig. 2).

El análisis mediante regresión lineal de las cifras de sIL-2R y ADA en exudados pleurales de origen tuberculoso evidencia una correlación positiva significativa entre estos dos factores (fig. 3).

Discusión

A pesar de los constantes progresos en el estudio de los diferentes componentes del líquido pleural y de la utilización de nuevos marcadores para su clasificación etio-

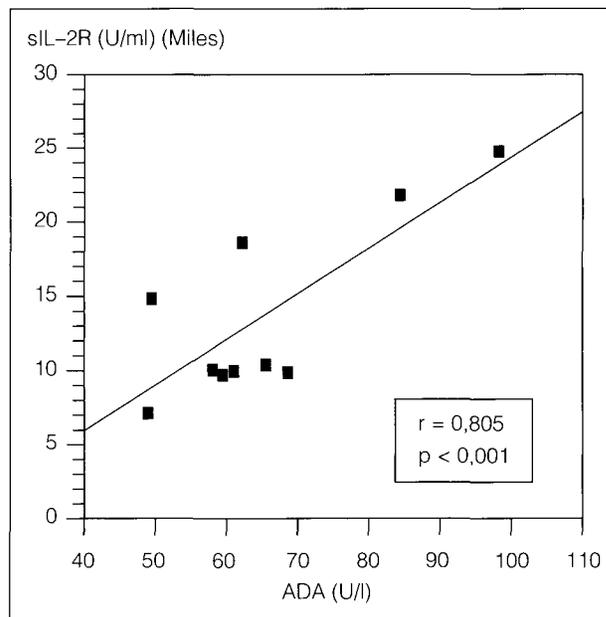
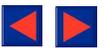


Fig. 3. Correlación entre el receptor soluble de interleucina 2 (sIL-2R) y adenosín-desaminasa (ADA) en el líquido pleural de los pacientes con tuberculosis pleuropulmonar.

lógica, existe todavía un porcentaje significativo de derrames pleurales cuya causa permanece desconocida al final del proceso diagnóstico¹⁰. Aunque la determinación de la actividad de la enzima ADA en el exudado pleural permita identificar la etiología tuberculosa del mismo con una sensibilidad cercana al 110%¹¹⁻¹⁴, se han descrito cifras de ADA muy elevadas en derrames pleurales de pacientes con patología no micobacteriana¹⁵, viéndose reducida por tanto la especificidad de este parámetro.

A diferencia de los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo en la determinación de sIL-2R en suero, donde no se observaron diferencias significativas en la concentración de esta molécula en las distintas patologías¹⁶, en el líquido pleural de los pacientes con tuberculosis hemos detectado niveles de sIL-2R significativamente más elevados que los registrados en los enfermos con derrames neoplásicos, paraneumónicos y trasudados (fig. 1). Este hallazgo, que es similar al descrito previamente por Ito et al⁸ y Takahashi et al⁹, se debe probablemente a una "compartimentalización" de la respuesta inmunitaria típica de la pleuritis tuberculosa¹⁷, en la cual es habitual encontrar niveles de sIL-2R del orden de 10 a 12 veces más elevados en el líquido pleural que en la sangre de los pacientes afectados^{9,16}. Este fenómeno inmunológico local tan peculiar ha sido imputado a la presencia de un mayor porcentaje de linfocitos T que responden al PPD en la efusión pleural que en la sangre periférica del enfermo¹⁸⁻²¹, con un claro predominio, además, de la subpoblación $T_H^{22,23}$. Así, a la considerable disminución en la síntesis de IL-2 por parte de los linfocitos T de la sangre periférica, que a menudo se manifiesta clínicamente en forma de anergia tuberculínica²⁴, se contraponen una liberación significativamente mayor de linfocinas por las células T presentes en el líquido pleural, sobre todo las producidas por lin-



focitos de tipo T_H1 : IFN- γ , IL-1 e IL-2²⁵⁻²⁷. La acumulación y la proliferación de los linfocitos T estarían en relación tanto con la elevada concentración local de antígenos micobacterianos por la proximidad del foco pulmonar como con la eliminación más lenta de sIL-2R y otras linfocinas por el reducido intercambio de las proteínas en el espacio pleural⁹.

En nuestro trabajo, las cifras de ADA obtenidas en el líquido pleural de enfermos tuberculosos han sido significativamente más elevadas que en los pacientes con derrames malignos, paraneumónicos o trasudados (fig. 2), confirmándose así su ya reconocida utilidad en el diagnóstico diferencial de este tipo de patología. Puede observarse que entre los enfermos no afectados de tuberculosis, se encontraron valores elevados de ADA sólo en el caso de un exudado empiematoso (no incluido en los cálculos estadísticos), probablemente debido a la presencia de una gran cantidad de polimorfonucleares, células abundantes provistas de esta enzima. No obstante, quizá el aspecto más interesante de esta parte del estudio es el hallazgo de una correlación muy estrecha entre los niveles de sIL-2R y ADA en los líquidos pleurales de origen tuberculoso (fig. 3), lo que apoyaría el planteamiento inicial de una posible utilización del sIL-2R para diferenciar la etiología micobacteriana de las otras causas de derrame. Desafortunadamente, el número limitado de casos investigados y el discreto grado de solapamiento que existe entre los valores de sIL-2R en el rango medio-bajo (entre 5.000 y 15.000 U/ml) (fig. 1) no permiten el establecimiento de un nivel de corte con una sensibilidad y especificidad adecuadas para el diagnóstico de la tuberculosis pleural, viéndose, por tanto, reducida su aplicación en la práctica clínica. En este sentido, en el momento actual, la determinación de la actividad de la ADA sigue siendo el instrumento más fiable para diferenciar las pleuresías tuberculosas de los derrames pleurales de distinta naturaleza.

En conclusión, el presente estudio confirma la presencia de niveles de sIL-2R significativamente más elevados en los exudados pleurales de pacientes con tuberculosis que en los derrames pleurales de otras etiologías. Sin embargo, su poder de discriminación parece ser insuficiente, siendo la ADA un parámetro más específico para orientar el diagnóstico diferencial de los derrames pleurales. No obstante, habida cuenta también de la excelente correlación existente entre sIL-2R y ADA, ambas moléculas podrían aportar información útil complementaria en casos individuales de difícil diagnóstico.

BIBLIOGRAFÍA

- Rubin LA, Nelson DL. The soluble interleukin-2 receptor: biology, function and clinical application. *Ann Intern Med* 1990; 113: 619-627.
- Brown AE, Rieder KT, Webster HK. Prolonged elevations of soluble interleukin-2 receptors in tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 1.036-1.038.
- Smith KA, Cantrell DA. Interleukin-2 regulates its own receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 864-868.
- Takeshita T, Asao H, Ohtani K, Ishii N, Kumaki S, Tanaka N et al. Cloning of the γ chain of the human IL-2 receptor. *Science* 1992; 257: 379-386.
- Voss SD, Sondel PM, Robb RJ. Characterization of the interleukin-2 receptors (IL-2R) expressed on human natural killer cells activated in vivo by IL-2: association of the p64 IL-2R γ chain with the IL-2R β chain in functional intermediate-affinity IL-2R. *J Exp Med* 1992; 176: 531-541.
- Rebollo A, Silva A. Intermediate- and high-affinity interleukin-2 receptors expressed in an IL-4-dependent T-cell line induce different signals. *Immunology* 1993; 80: 229-235.
- Takeshita T, Ohtani K, Asao H, Kumaki S, Nakamura M, Sugamura K. An associated molecule, p64, with IL-2 receptor β chain. Its possible involvement in the formation of the functional intermediate-affinity IL-2 receptor complex. *J Immunol* 1992; 148: 2.154-2.158.
- Ito M, Kojiro N, Shirasaka T, Moriaki Y, Tachibana I, Kokubu T. Elevated levels of soluble interleukin-2 receptors in tuberculous pleural effusions. *Chest* 1990; 97: 1.141-1.143.
- Takahashi S, Setoguchi Y, Nukiwa T, Kira S. Soluble interleukin-2 receptor in sera of patients with pulmonary tuberculosis. *Chest* 1991; 99: 310-314.
- Marín Pérez A. Derrames pleurales: un problema diagnóstico [editorial]. *Med Clin (Barc)* 1988; 90: 329-331.
- Ocaña I, Martínez Vázquez JM, Segura RM, Fernández de Sevilla T, Capdevilla JA. Adenosine deaminase in pleural fluid. Test for diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Chest* 1983; 84: 51-53.
- Granados Navarrete A, Blavia Aloy R, Boada Port J, Moreno Píñillos R, Rodríguez Sanchón B, Manresa Presa F. Pleuritis tuberculosa. 232 casos. Evolución de los procedimientos diagnósticos. *Histología, bacteriología y adenosindesaminasa (ADA)*. *An Med Intern* 1986; 3: 517-520.
- Piras MA, Gakis C, Buchoni M, Andreoni G. Adenosine deaminase activity in pleural effusions: an aid to differential diagnosis. *Br Med J* 1987; 2: 1.751-1.752.
- Pérez de Oteiza C, Chantres MT, Rebollar JL, Muñoz Yáñez MC, García Marcos F, Pérez Barba M et al. Adenosina desaminasa (ADA) en los derrames pleurales. Su utilidad en el diagnóstico de la pleuresía tuberculosa. *An Med Intern* 1989; 6: 244-248.
- Pérez Vidal R, Arán X, Broquetas J. High adenosine deaminase activity level in pleural effusion. *Chest* 1986; 90: 625-627.
- Avilés Inglés MJ, Contessotto C, Ontañón Rodríguez J, García Alonso A, Muro Amador M, Canteras Jordana M et al. Serum soluble interleukin-2 receptor: a useful indicator of the clinical course in pulmonary tuberculosis. *Tubercle Lung Dis* 1995; 76: 130-135.
- Barnes PF, Mistry SD, Cooper CL, Pirmez C, Rea TH, Modlin RL. Compartmentalization of a CD4+ T lymphocyte subpopulation in tuberculous pleuritis. *J Immunol* 1989; 22: 1.114-1.119.
- Fujiwara H, Tsuyuguchi I. Frequency of tuberculin-reactive T-lymphocytes in pleural fluid and blood from patients with tuberculous pleurisy. *Chest* 1983; 84: 51-52.
- Petterson T, Klockars M, Hellstrom PE. T and B lymphocytes in pleural effusions. *Chest* 1978; 73: 49-51.
- Ellner JJ. Pleural fluid and peripheral blood lymphocyte function in tuberculosis. *Ann Intern Med* 1987; 89: 932-933.
- Fujiwara H, Okuda Y, Fukukawa T, Tsuyuguchi I. In vitro tuberculin reactivity of lymphocytes from patients with tuberculous pleurisy. *Infect Immun* 1982; 35: 402-409.
- Albera C, Malutto I, Ghio P, Scagliotti GV, Pozzi E. Lymphocyte subpopulations analysis in pleural fluid and peripheral blood in patients with lymphocytic pleural effusions. *Respiration* 1991; 58: 65-71.
- Shiratsuchi H, Tsuyuguchi I. Analysis of T cell subsets by monoclonal antibodies in patients with tuberculosis after in vitro stimulation with purified protein derivative of tuberculin. *Clin Exp Immunol* 1984; 57: 271-278.
- Toossi Z, Kleinhenz ME, Ellner JJ. Defective interleukin-2 production and responsiveness in human pulmonary tuberculosis. *J Exp Med* 1986; 163: 1.162-1.172.
- Ribera E, Español T, Martínez Vázquez JM, Ocaña I, Encabo G. Lymphocyte proliferation and gamma-interferon production after "in vitro" stimulation with PPD. Differences between tuberculous and non tuberculous pleurisy in patients with positive tuberculin skin test. *Chest* 1990; 97: 1.381-1.385.
- Shimokata K, Saka H, Murate T, Hasegawa Y, Hasegawa T. Cytokine content in pleural effusion. Comparison between tuberculous and carcinomatous pleurisy. *Chest* 1991; 5: 1.103-1.107.
- Barnes PF, Lu S, Abrams JS, Wang E, Yamamura M, Modlin RL. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect Immun* 1993; 61: 3.482-3.489.