

Artículo ganador, como trabajo libre de investigación básica, en el LXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello.

Importancia de la caracterización fenotípica y funcional de linfocitos T en tejido amigdalino en pacientes aptos para amigdalectomía

José Antonio Talayero Petra,* Armando Catorena Maldonado,* Antonio Soda Merhy,* Leslie Chávez Galán,* Isabel Sada Ovalle*

Resumen

ANteCedeNteS

Las amígdalas palatinas son una barrera anatómica y funcional que dependen de la intervención del sistema inmunológico adaptativo. En casos de amigdalitis crónica, los procesos de presentación antigénica y activación celular pueden modificarse, por lo que remover de forma terapéutica las amígdalas crónicamente enfermas habría que considerarse una ventaja potencial.

ObjetIvOS

Identificar las características fenotípicas y funcionales de los linfocitos *t* y *b* y las células dendríticas del tejido amigdalino. Valorar el efecto terapéutico que esto puede tener en la toma de decisiones para el manejo de estos pacientes.

PACIeNteS y MéTODOS

Se estudiaron 10 pacientes en edad pediátrica con indicación de amigdalectomía, para obtener células mononucleares palatinas e identificar a las subpoblaciones linfoides y mieloides mediante citometría de flujo. Posteriormente se evaluó la funcionalidad de los linfocitos *t* Cd4+ y *t* Cd8+.

ReSuLtAdOS

Se demostró que los linfocitos *t* Cd4+ y *t* Cd8+ son funcionales con base en su capacidad para producir múltiples citocinas simultáneamente, ejercer actividad citotóxica y diferenciarse en poblaciones de memoria. El estudio de las poblaciones de células dendríticas, mieloides y plasmocitoides reveló que en el tejido amigdalino hay 1.39% de células mieloides y 0.19% de plasmocitoides.

CONCLuSIONeS

Los linfocitos *t* Cd4+ y Cd8+ de tejido amigdalino son funcionales a pesar de haber estado sometidos a estimulación crónica por infecciones de repetición. Contrario a lo que sustenta la bibliografía, los autores rechazan la posibilidad de que sea un tejido disfuncional en mayor o menor grado.

Abstract

bACKgROuNd

The palatine tonsils are an anatomical and functional barrier that depend on the intervention of the adaptive immune system. In cases of chronic tonsillitis, antigen presentation and cell activation processes can be modified, so removing therapeutically tonsils which are chronically sick should be considered a potential advantage.

ObjeCtIveS

To identify the phenotypic and functional characteristics of lymphocytes *t* and *b* and tonsillar tissue dendritic cells. To assess the therapeutic impact of this measure on decision-making for the management of these patients.

PAtIeNtS ANd MethOdS

Ten pediatric patients referred to tonsillectomy were studied to obtain palatal mononuclear cells and to identify lymphoid and myeloid subpopulations by flow cytometry. Later, we assessed the functionality of *t* lymphocytes Cd4 and Cd8.

ReSuLtS

t lymphocytes Cd4 and Cd8 are considered functional due to their ability to produce multiple cytokines, to exert cytotoxic activity and to differentiate in populations of memory. The study of populations of myeloid, plasmacytoid and dendritic cells revealed that there is 1.39% myeloid cells and 0.19% plasmacytoid cells in the tonsillar tissue.

CONCLuSIONS

t lymphocytes Cd 4 and Cd 8 of tonsillar tissue are functional despite being subjected to chronic stimulation for repeat infections. Contrary to the literature, we reject that this tissue is dysfunctional.

Palabras clave:

amígdalas, células dendríticas, linfocitos t, amigdalectomía.

Key words:

tonsils, dendritic cells, t lymphocytes, tonsillectomy.

Antecedentes

Histología e inmunología de las amígdalas palatinas

Las amígdalas y adenoides son órganos linfoides en donde predominan las células B (50 a 60% de todos los linfocitos). Los linfocitos T comprenden aproximadamente 40% de los linfocitos, mientras que 3% lo constituyen las células plasmáticas maduras. Por el contrario, 70% de los linfocitos en la sangre periférica son linfocitos T. Las amígdalas palatinas y las adenoides están implicadas en la inmunidad secretora y en la regulación de la producción de inmunoglobulinas secretoras.¹

Las amígdalas palatinas no tienen vasos linfáticos aferentes y contienen 10 a 30 criptas (invaginaciones) que van hacia el parénquima y están delimitadas por un epitelio escamoso especializado para el procesamiento antigénico. Este epitelio críptico tiene un complejo sistema de células presentadoras de antígenos y de microporos que dirigen los antígenos a las células linfoides inmunológicamente activas por debajo del epitelio tonsilar (hacia el folículo linfoide). Existen cuatro zonas o compartimentos inmunorreactivos que son importantes y que están implicados en el procesamiento antigénico: 1) epitelio escamoso especializado con células reticulares; 2) área extrafolicular (rica en células T); 3) zona de manta del folículo linfoide y 4) centro germinal (células B). Un fenómeno opuesto puede identificarse en los linfonodos, ya que éstos dependen de la entrega antigénica a través de linfáticos aferentes.^{1,2}

Las amígdalas palatinas son el sitio en donde una gran variedad de patógenos se multiplican y persisten de manera indefinida; por esta razón, la intervención de los linfocitos T (CD4+ y CD8+) es fundamental. Ambas poblaciones de linfocitos tienen la capacidad de controlar la diseminación bacteriana promoviendo la producción de citocinas proinflamatorias y a través de su actividad citotóxica.³ Los linfocitos B CD19+ también participan activamente, ya que inducen la

producción de anticuerpos neutralizantes contra los principales virus respiratorios.⁴ No menos importantes son los múltiples tipos de células dendríticas, las cuales funcionan como células presentadoras de antígeno induciendo la activación de los linfocitos T que no han tenido experiencia antigénica.⁵

Fisiología y fisiopatología de las amígdalas palatinas

Las amígdalas palatinas representan la principal barrera protectora del aparato digestivo y respiratorio contra potenciales patógenos invasores. Las amígdalas y las adenoides son órganos inmunológicamente activos que, por lo general, refuerzan la inmunidad dependiente de las mucosas de toda la vía aerodigestiva superior. También son expuestas de manera continua a una gran variedad de estímulos físicos y químicos, como: contaminantes del medio ambiente, alcohol, humo de tabaco y ácidos gástricos; todos ellos pueden modificar las características fenotípicas y funcionales de las células del sistema inmunológico presentes en este tejido linfoide.^{1,6,7}

Las amígdalas en el ser humano son inmunológicamente más activas a la edad de tres a diez años. La involución de éstas ocurre después de la pubertad, lo que resulta en disminución de la población de células B y en aumento relativo de la relación entre células T y células B. A pesar de que en la producción global de inmunoglobulinas se ve afectada la función, todavía se llega a ver una actividad considerable de las células B en amígdalas sanas de pacientes de 80 años de edad.⁸ Esta situación es distinta en pacientes con cambios inducidos por la enfermedad, como la amigdalitis de repetición o la hipertrofia adenoidea.

Las células M que se encuentran en el sistema de canales especializados del epitelio amigdalino reticulado y críptico capturan los antígenos en vesículas y los transportan a la región extrafolicular o a los folículos linfoides. En la región

* Instituto Nacional de enfermedades Respiratorias.

Correspondencia: dr. José Antonio Talayero Petra. Instituto Nacional de enfermedades Respiratorias. Calzada de Tlalpan 4502, colonia Sección XVI, CP 14080, México, dF.

Recibido: mayo, 2012. Aceptado: julio, 2012.

este artículo debe citarse como: Talayero-Petra JA, Catorena-Maldonado A, Soda-Merhy A, Chávez-galán L, Sada-Ovalle I. Importancia de la caracterización fenotípica y funcional de linfocitos t en tejido amigdalino en pacientes aptos para amigdalectomía. An OrL Mex 2012;57(3):119-132.

extrafolicular, las células dendríticas interdigitantes y los macrófagos procesan los antígenos y los presentan a los linfocitos T cooperadores y citotóxicos. Estos linfocitos T estimulan la proliferación de los linfocitos B foliculares y su desarrollo en las células B de memoria que secretan anticuerpos capaces de migrar a la nasofaringe y a otros sitios, o en las células plasmáticas que producen anticuerpos y los liberan en el lumen de la cripta.⁹

La exocitosis granular, o liberación de gránulos citotóxicos, es uno de los mecanismos clave presentes en los linfocitos T CD8+ y células NK para eliminar células infectadas por virus y células tumorales. Los gránulos citotóxicos son lisosomas secretores especializados que contienen proteínas formadoras de poros, conocidas como perforinas, y una familia de proteasas de serina conocidas como granzimas. Las granzimas son inicialmente proenzimas inactivas que se convierten en enzimas activas a través de la acción de la catepsina C. Las granzimas A y B son las más abundantes, en particular la granzima B, que participa en la activación de la vía de las caspasas que inducen la apoptosis.¹⁰

En casos de amigdalitis crónica o recurrente, el proceso controlado de transporte y presentación antigénica puede verse modificado debido a la pérdida de células M del epitelio amigdalino.⁹ La respuesta inflamatoria crónica puede mediar la transformación del epitelio reticular críptico en un epitelio queratinizado que limite la funcionalidad de los linfocitos T y B.¹¹ Se ha propuesto que estos cambios modifican la frecuencia, la distribución y el nivel de activación de los linfocitos B en el centro germinal y, por ende, alteran la producción de anticuerpos.

En casos de amigdalitis crónica o de repetición, los linfocitos T y B se encuentran sometidos a estimulación crónica persistente, lo que puede limitar, al menos teóricamente, su capacidad funcional y de protección. Esto, por tanto, resulta en la ventaja potencial de remover de forma terapéutica las amígdalas enfermas crónica o recurrentemente;¹² sin embargo, a la fecha no hay estudios que demuestren el efecto clínico significativo de la amigdalectomía en el sistema inmunológico o en la producción final de sustancias efectoras a nivel local.

En contraste con la amigdalitis de repetición, en la hiperplasia adenoidea los cambios son menos pronunciados, pues las condiciones inmunorreguladoras necesarias para el mantenimiento de la población de las células B están estables. Se cree que la razón de esto es que el epitelio reticular está menos afectado en la inflamación adenoidea que en la amigdalina.¹

Efecto en la función inmunológica de pacientes programados para amigdalectomía

Las funciones inmunológicas de las amígdalas y las adenoides han propiciado una serie de argumentos contra la

adenoamigdalectomía. Existe una gran controversia en cuanto a los beneficios de la extirpación de un tejido crónicamente inflamado, dada la posibilidad de eliminar una fuente local importante de defensa del huésped.¹³ La pregunta de si la extirpación de amígdalas y adenoides afecta la protección de la vía aérea superior causando cierto grado de inmunodeficiencia continúa siendo tema de debate.¹⁴ Varios investigadores han comprobado una disminución en las concentraciones de inmunoglobulinas posterior a la adenoamigdalectomía, mientras que otros no han encontrado cambios significativos; sin embargo, diversos estudios sugieren que este procedimiento quirúrgico no modifica el desarrollo inmunológico del paciente hasta el punto de llevarlo a un estado de inmunodeficiencia.¹⁵

Adenoamigdalectomía. Criterios y justificaciones para su realización

La amigdalectomía es uno de los procedimientos quirúrgicos más frecuentes en Estados Unidos, y representa la segunda causa de cirugía ambulatoria, con más de 530 mil procedimientos quirúrgicos efectuados anualmente en niños menores de 15 años.¹⁶

Las dos indicaciones más comunes de amigdalectomía son cuadros de faringoamigdalitis de repetición y trastornos respiratorios del dormir, en particular el síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS). Ambos pueden afectar sustancialmente la salud y la calidad de vida del niño.^{12,17,18}

Justificación

Existe poca información acerca de las diferentes subpoblaciones linfocitarias del tejido amigdalino y de su capacidad funcional en un tejido linfoide crónicamente expuesto a múltiples estímulos, muchos de los cuales son de origen infeccioso (amigdalitis recurrente).

Al explorar las principales características fenotípicas de los linfocitos T provenientes del tejido amigdalino, así como su función, podría conocerse a mayor profundidad el tipo de respuesta inmunológica de un órgano linfoide secundario.

Este conocimiento sería relevante, ya que permitiría, al menos teóricamente, contar con un mayor número de elementos científicos para indicar la amigdalectomía a determinados pacientes.

Hipótesis

Este estudio tiene un carácter descriptivo acerca de las subpoblaciones linfocitarias en el tejido amigdalino; por tanto, no puede plantearse una hipótesis con magnitud y dirección.

Se cree que algunas de las subpoblaciones de linfocitos T tienen menor capacidad de respuesta a la estimulación antigénica. Dicha hipofuncionalidad es un punto relevante a considerar en el tratamiento quirúrgico de un paciente.

Objetivos Generales

1. Identificar las principales características fenotípicas y funcionales de los linfocitos T CD4+ y CD8+ y las células dendríticas de las amígdalas palatinas de niños programados para amigdalectomía.
2. Valorar el efecto terapéutico que puede tener dicha identificación en la toma de decisiones del procedimiento quirúrgico.

Específicos

1. Estandarizar la metodología para la obtención de células mononucleadas del tejido amigdalino.
2. Identificar la frecuencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ y subpoblaciones de células dendríticas en el tejido amigdalino.
3. Detectar la frecuencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ antígeno específicos.
4. Medir la capacidad funcional de los linfocitos T CD4+ y CD8+ con base en su habilidad para producir perforina y granzima A.

Pacientes y métodos

Se realizó un estudio prospectivo, observacional y transversal que incluyó a 10 pacientes en edad pediátrica con indicación de adenoamigdalectomía. Debido a la edad de los sujetos, se pidió a los padres o tutores que dieran su autorización firmando una carta de consentimiento informado. Este protocolo fue aprobado por el Comité Institucional de Ciencia y Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

Criterios de inclusión

Se incluyeron en el estudio los pacientes de 2 a 14 años de edad, de uno u otro sexo, que reunieran los criterios para que se les realizara amigdalectomía o adenoamigdalectomía, siempre que sus padres o tutores firmaran el consentimiento informado.

Criterios de exclusión

Se excluyeron los pacientes que sufrían alguna enfermedad sistémica u otra forma de inmunodepresión; a los que estaban programados para amigdalectomía por causas distintas al objetivo de este trabajo (sospecha de neoplasia o afección linfoproliferativa); a los que tenían inmunodeficiencias u otros trastornos inmunológicos y a quienes sus padres o tutores no aceptaron firmar la carta de consentimiento informado.

Realización de la amigdalectomía

1. Previa anestesia general e intubación orotraqueal, se colocaron campos estériles y abreboque de Mc Ivor al

paciente, quien debía estar en posición de decúbito supino.

2. Se identificaron las amígdalas palatinas y con la pinza de Allis se tomó el polo superior de la amígdala izquierda y se mediatizó; se hizo una incisión en el plica triangularis con bisturí falciforme y se disecó con tijera de Knight hasta encontrar el plano subcapsular.
3. Se continuó la disección con disector de Hurd hasta el polo inferior, y se extrajo la amígdala con el asa de Tyding.
4. Se hizo hemostasia con pinza bipolar en los sitios sangrantes del lecho amigdalino y, de ser necesario, se colocaron puntos hemostáticos con sutura catgut 3-0.
5. Se palparon las adenoides; al ser obstructivas, se retiraron con adenotomo libre o de canastilla.
6. Se realizó el mismo procedimiento en la amígdala derecha.
7. Se hicieron lavados con solución en la nasofaringe hasta que se obtuvo agua de roca.
8. Se verificó la hemostasia y se dio por terminado el procedimiento quirúrgico.

Inmediatamente después de haber retirado la amígdala palatina izquierda, se le entregó a la enfermera instrumentista quien, con la ayuda de la enfermera circulante, la depositó en medio RPMI 1640 suplementada y estéril, proporcionado en un inicio por personal del servicio de inmunología integrativa del Instituto. La enfermera circulante entregó el tejido recolectado a dicho servicio, donde se procesó en un lapso no mayor a 60 minutos.

Obtención de células mononucleares palatinas

Una vez realizada la amigdalectomía, los especímenes se colocaron en un tubo plástico de 50 mL en medio de cultivo RPMI 1640 frío hasta su procesamiento. Dado que la viabilidad del tejido disminuye con el tiempo, hay que procesarlos en un tiempo máximo de tres horas.

Se transfirieron las amígdalas palatinas a un plato de Petri con 20 mL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado (10% de suero fetal bovino, 2% de HEPES, 10% de L-glutamina, 10% de penicilina-estreptomicina, 10% de aminoácidos esenciales, 10% de aminoácidos no esenciales y 10% de piruvato de sodio).

Se cortó el tejido amigdalino en pequeños fragmentos de 2 a 3 mm con tijeras de disección.

Con la ayuda de pinzas de disección estériles, se transfirieron los fragmentos de tejido amigdalino a un colador metálico que tenía una malla de 60 μ m. Se efectuaron pequeños

movimientos circulares con el émbolo estéril de una jeringa de 3 cc para homogeneizar el tejido y facilitar el paso de las células. Se adicionaron 1 a 2 mL de medio de cultivo cada vez que fue necesario.

Se colocó un filtro para células (marca Falcón, 10- μ m) en un tubo cónico de 50 mL y se pasó a través de éste la suspensión celular con la finalidad de eliminar el resto de los fragmentos tisulares.

Se transfirió la suspensión celular a tubos cónicos de 10 mL que contenían 3 mL de Ficoll-Hypaque (densidad 1.077) y se centrifugaron durante 30 minutos a 1,700 rpm. Se aceleró y desaceleró sin freno.

Se colectaron las células mononucleadas de la interfase, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en RPMI 1640 suplementado a una concentración de 1×10^6 células/mL.

Se evaluó la viabilidad celular por el método de exclusión del colorante azul de tripano.

Identificación de subpoblaciones linfoides y mieloides en el tejido amigdalino

Para identificar la frecuencia de las poblaciones de células linfoides y mieloides en el tejido amigdalino se utilizaron anticuerpos dirigidos contra los siguientes marcadores de superficie: CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD19, CD20, CD40, CD80, CD83, CD86, CD123 y HLA-DR.

Protocolo de tinción: se incubaron las células durante 15 minutos a temperatura ambiente con 50 μ L del coctel de anticuerpos previamente diseñado. Después, las células se lavaron con búfer salino-fosfato (PBS) y se fijaron en paraformaldehído a 1%. Las muestras se adquirieron en un citómetro FACSAria (BD Biosciences) y se analizaron con el programa FlowJo (Tree Star).

Identificación de linfocitos T antígeno específicos

Se resuspendieron las células mononucleares palatinas a una concentración de 1×10^6 células/mL en RPMI 1640 suplementado y se sembraron en placas de cultivo (Costar) de 24 pozos. Se adicionó anticuerpo anti-CD154-APC humano (previamente titulado), al igual que monensina y brefeldina (2 μ M [5 μ g/mL], concentración final) a cada uno de los pozos, según la correspondencia con el diseño experimental deseado. A los pozos que requirieron estimulación se les agregó 1 μ L de enterotoxina B del estafilococo (SEB). Se incubó la placa durante 12 a 24 horas a 37°C, a 5% de CO₂. Al terminar el tiempo de incubación se continuó con el protocolo de tinción.

Evaluación de la capacidad de degranulación de los linfocitos T CD4 y CD8+

Se resuspendieron las células mononucleares palatinas a una concentración de 1×10^6 células/mL en RPMI 1640

suplementado y se sembraron en placas de cultivo (Costar) de 24 pozos. Se adicionaron anticuerpos anti-CD107a-PE y anti-CD107b-FITC antes de la estimulación antigénica. Para los pozos que requirieron ser estimulados, se agregó 1 μ L de enterotoxina B del estafilococo o 10 ng/mL de acetato de forbol miristato (PMA, *phorbol myristate acetate*) más 1 μ M de ionomicina, de acuerdo con el diseño experimental deseado. Se incubó la placa durante seis horas a 37°C, con 5% de CO₂. Al terminar el tiempo de incubación se continuó con el protocolo de tinción.

Citometría de flujo multiparamétrica y protocolo de tinción

1. Para la caracterización fenotípica y funcional de los linfocitos T antígeno específicos se utilizaron los siguientes anticuerpos dirigidos contra los marcadores de superficie: CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD69, CD107a, CD107b, CD154 y CCR7.
2. Para la caracterización fenotípica de las células dendríticas se usaron anticuerpos dirigidos contra los siguientes marcadores de superficie: CD1a, CD11b, CD11c, CD68, CD123, CCR7 y HLA-DR.

Protocolo de tinción: se incubaron las células durante 15 minutos a temperatura ambiente con 50 μ L del coctel de anticuerpos previamente diseñado. Después, las células se lavaron con búfer salino-fosfato (PBS) y se fijaron en paraformaldehído a 1%. Las muestras se recolectaron en un citómetro FACSAria (BD Biosciences) y se analizaron con el programa FlowJo (Tree Star).

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como proporciones y mediana e intervalo intercuartilar. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

Limitaciones del proyecto

La descripción fenotípica y funcional de las células del sistema inmunológico de los órganos linfoides secundarios puede ser mucho más amplia que la propuesta en este protocolo; sin embargo, se identificó la frecuencia de las principales poblaciones de linfocitos T y B, así como la frecuencia de células T antígeno específicas del tejido amigdalino. De igual manera, se hizo una caracterización fenotípica completa de las principales poblaciones de células dendríticas.

Consideraciones éticas

La entrevista, el estudio simplificado del sueño y el manejo quirúrgico de cada paciente fueron los que indicó el Departamento de Otorrinolaringología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. El estudio

no tuvo costo extra para ninguno de los sujetos, ya que la institución condonó la cuota.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética en Investigación, con el número B14-11.

Resultados

Población de estudio

Se incluyeron 10 pacientes que reunieron los criterios específicos para practicarles adenoamigdalectomía. En el Cuadro 1 se muestran las características demográficas de la población estudiada y los diagnósticos específicos.

La mediana de edad de los pacientes a quienes se les efectuó amigdalectomía fue de seis años; la mayoría de ellos eran hombres (80%). La mediana del índice de masa corporal (IMC) fue de 16.6, de acuerdo con la fórmula peso/(talla)². El grado de hipertrofia amigdalina, evaluada de forma prequirúrgica, fue obstructivo (III o IV) en 80% de los pacientes, en tanto que en dos fue grado II.

El 60% de los pacientes estudiados tenía un diagnóstico prequirúrgico de rinitis alérgica, mientras que 90% refirió, durante la evaluación prequirúrgica, cuadros de faringoamigdalitis bacteriana de repetición; 60% tenía ambos diagnósti-

cos. A ocho pacientes se les realizó adenoamigdalectomía a causa de hipertrofia adenoidea.

Cabe mencionar que 9 de los 10 sujetos estudiados tenía síndrome de apnea obstructiva del sueño, diagnosticado mediante estudio simplificado del sueño. Esto se debe a que es más probable encontrar pacientes con mayor número de comorbilidades e incluso de cuadros complicados en un centro de referencia de tercer nivel, como el INER Ismael Cosío Villegas.

Características inmunológicas basales

La caracterización inmunofenotípica de las células mononucleares palatinas se realizó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra los siguientes marcadores de superficie: CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD45RA, CD62L, CCR7 e IgD. En la Figura 1 se muestra un ejemplo representativo del tipo de estrategia de análisis que se siguió para identificar las subpoblaciones de linfocitos T (CD4+ y CD8+) y de linfocitos B totales.

En la Figura 1 se representa la estrategia de análisis multiparamétrico para las poblaciones de linfocitos T y B totales: A) las células mononucleadas totales se identificaron a partir de un gráfico de puntos de dispersión frontal (FSC, *forward*

Cuadro 1. Características basales de la población de estudio

Paciente	Edad	Género	Peso (kg)	Talla (m)	IMC	Grado de hipertrofia amigdalina	Diagnóstico de rinitis alérgica	FAR	Intervención quirúrgica realizada
1	9 años 7 meses	M	46.7	1.44	22.5	III bilateral	Sí	Sí	Adenoamigdalectomía
2	8 años 9 meses	M	50.4	1.45	23.9	IV der III izq	No	Sí	Amigdalectomía
3	4 años 8 meses	M	21.5	1.12	17.1	IV der III izq	No	Sí	Adenoamigdalectomía
4	3 años 11 meses	M	16.7	1.03	15.7	IV der III izq	Sí	Sí	Adenoamigdalectomía
5	4 años 11 meses	M	20.5	1.17	14.9	II bilateral	Sí	Sí	Adenoamigdalectomía
6	5 años 11 meses	F	22.5	1.17	16.4	IV der III izq	Sí	Sí	Adenoamigdalectomía
7	4 años 2 meses	M	14.5	1.065	12.7	II bilateral	Sí	Sí	Adenoamigdalectomía
8	6 años 8 meses	M	20	1.09	16.8	II bilateral	No	No	Adenoamigdalectomía
9	7 años 8 meses	M	31	1.32	17.3	III bilateral	Sí	Sí	Amigdalectomía
10	6 años 2 meses	F	25	1.23	16.5	III bilateral	No	Sí	Adenoamigdalectomía
Mediana	6.07 ± 2.1		22.0 (14.5-50.4)	1.17 (1.03-1.45)	16.6 (12.7-23.9)				

M: masculino; F: femenino; IMC: índice de masa corporal; FAR: cuadros recurrentes de faringoamigdalitis bacteriana de repetición.

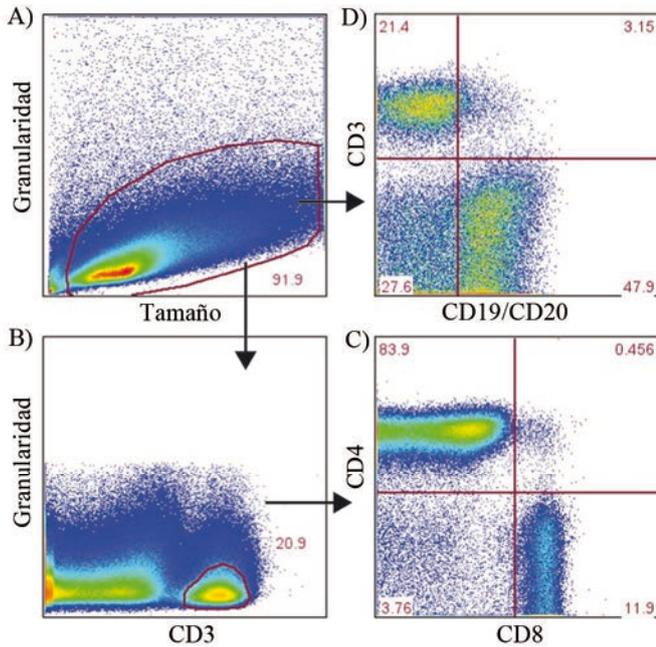


Figura 1. Análisis de células mononucleadas palatinas.

scatter) vs dispersión lateral (SSC, side scatter); b) a partir de una ventana de células vivas se seleccionó la ventana positiva para el marcador CD3 (linfocitos T totales); c) a partir de la ventana de CD3 se identificaron los linfocitos T CD3+CD4+ y CD3+CD8+ (positivos a la doble marca); y d) a partir de la ventana de células vivas se hizo un gráfico de puntos de CD3 contra CD19 para identificar a los linfocitos B (CD19+). Se analizó un mínimo de 10⁵ eventos.

El Cuadro 2 muestra la frecuencia de cada una de estas subpoblaciones que se analizaron en los 10 pacientes. La frecuencia de linfocitos T totales CD3+ fue de 18% ± 2.4, con una relación CD4:CD8 igual a 5.02; en tanto que la

Cuadro 2. Frecuencia de linfocitos T y B en el tejido amigdalino	
Población	Frecuencia (%)
Linfocitos T	18 ± 2.49
Linfocitos T CD4+	73.9 ± 8.3
Linfocitos T CD8+	14.7 ± 5.2
Linfocitos B	32.9 ± 11.3

frecuencia de linfocitos B totales en el tejido amigdalino fue de 32.9% ± 11.3.

Posteriormente, se analizó la frecuencia de las cuatro principales subpoblaciones de memoria en que se puede clasificar a los linfocitos T una vez que han reconocido antígenos pro-

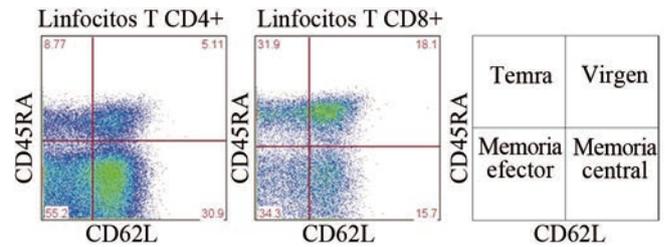


Figura 2. Expresión de marcadores específicos de linfocitos T.

venientes de patógenos: 1) linfocito T efector terminalmente diferenciado T_{EMRA}, 2) linfocito T virgen, 3) linfocito T de memoria central y 4) linfocito T de memoria-efector. Esta clasificación de los linfocitos se basó en la expresión de los marcadores CD45RA, CD62L y CCR7 (Figura 2).

En la Figura 2 se observa el perfil fenotípico de linfocitos T de memoria. A partir de una ventana de linfocitos T totales (CD3+) se hizo un gráfico de puntos de CD45RA contra CD62L. Con base en la expresión de estos marcadores se identificaron cuatro subpoblaciones de memoria: 1) T_{EMRA} (CD45RA+CD62L-), 2) T virgen (CD45RA+CD62L+), 3) T_{MC} (CD45RA-CD62L+) y 4) T_{ME} (CD45RA-CD62L-). Se analizó un mínimo de 10⁵ eventos.

En el Cuadro 3 se enlistan los datos de los 10 pacientes referentes a la frecuencia de cada una de estas subpoblaciones de memoria, así como a la intensidad media de fluorescencia para el marcador CCR7.

Mediante una estrategia semejante se analizaron las subpoblaciones de memoria en que se puede clasificar a los linfocitos B que se localizan en los folículos linfoides de la amígdala. Este análisis se basó en la expresión de los marcadores CD38 e IgD (Figura 3A y B). La expresión de IgD en el linfocito B se utiliza para identificar a los linfocitos B maduros. Se encontró que 54.6% ± 3.7 de los linfocitos B expresan a la IgD en la superficie.

En la Figura 3, al graficar el perfil fenotípico de linfocitos B de memoria, se observa: A) a partir de una ventana de células vivas, se realizó un gráfico de puntos de CD3 contra CD19/CD20 para identificar a los linfocitos B totales (CD3-CD19/CD20+); b) a partir de una ventana de linfocitos B (CD3-CD19/CD20+) se hizo un dot plot de CD38 contra IgD para detectar las células de memoria. Con base en la expresión de estos dos marcadores se identificaron las siguientes subpoblaciones: células vírgenes (Bm1: IgD+CD38-), células vírgenes activadas (Bm2: IgD+CD38+), células pre-GC (Bm2'; IgD+CD38++), células GC (Bm3-centroblastos y Bm4-centrocitos, ambas son IgD-CD38++), y células de memoria (Bm5 tempranas y tardías: IgD-CD38+/-); C) a partir de una ventana de linfocitos B totales (CD19/CD20+) se

Cuadro 3. Frecuencia de subpoblaciones de células de memoria presentes en los linfocitos T CD4+ y CD8+

Población	Linfocitos T CD4		Linfocitos T CD8	
	Frecuencia (%)	CCR7 IMF (unidades arbitrarias)	Frecuencia (%)	CCR7 IMF (unidades arbitrarias)
T _{MC}	30.3 (29.2-54.6)	1,130 (896-1,829)	16.9 (6-25.3)	1,921 (1,132-2,740)
Virgen	4.8 (2.7-8.2)	3,481 (2,623-4,043)	20.0 (15.9-36.9)	4,527 (2,929-5,553)
T _{EMRA}	5.7 (2.7-9)	3,295 (2,786-4,144)	33.6 (27.3-51)	4,488 (2,129-4,847)
T _{ME}	56.4 (38.9-62.4)	1,234 (916-1,521)	33.5 (10.5-51.6)	705 (503-826)

La cifras representan: mediana (mín-máx).

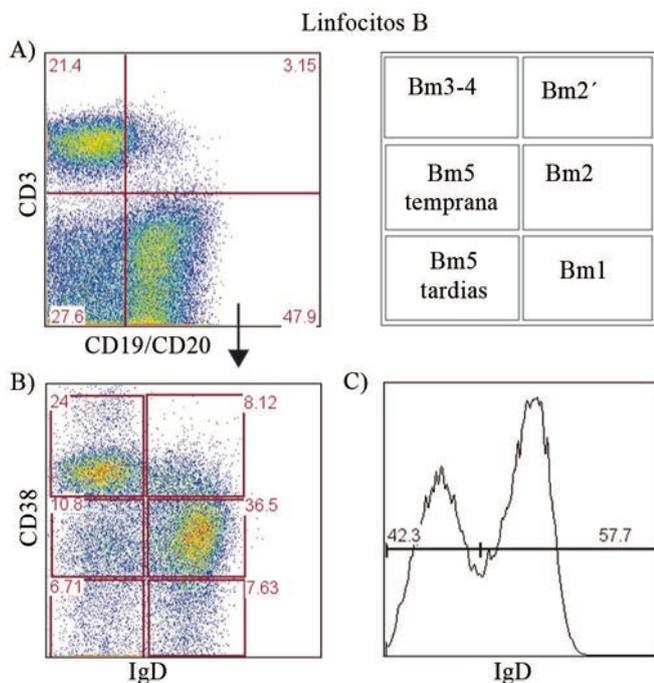


Figura 3. Perfil fenotípico de los linfocitos B.

efectuó un histograma para medir la expresión del marcador IgD. Se analizó un mínimo de 10⁵ eventos.

El Cuadro 4 muestra el resumen de las frecuencias de linfocitos B de memoria evaluadas en los 10 pacientes incluidos en el estudio.

Frecuencia de linfocitos T CD4+ antígeno específicos en el tejido amigdalino

Una vez caracterizadas las distintas subpoblaciones en los linfocitos T CD4+, se procedió a evaluar la frecuencia de linfocitos T antígeno específicos mediante un ensayo que valora la expresión del marcador CD154 (CD40L). Después de cuatro horas de estímulo con la enterotoxina B del estafilococo (SEB), se midió la expresión del marcador CD154 en la superficie de los linfocitos CD4+. Los resultados muestran que 5.3% de los linfocitos T CD4+ expresan CD154 de

Cuadro 4. Frecuencia de subpoblaciones de células de memoria presentes en los linfocitos B

Población	Frecuencia
Bm1	6.2 (4.9-7.6)
Bm2	27 (10.7-36.5)
Bm2	8.12 (7.9-8.4)
Bm3 + Bm4	36.0 (33.9-55.4)
Bm5 tempranas	9.8 (9.2-14.0)
Bm5 tardías	6.7 (5.7-10.5)

La cifras representan: mediana (mín-máx).

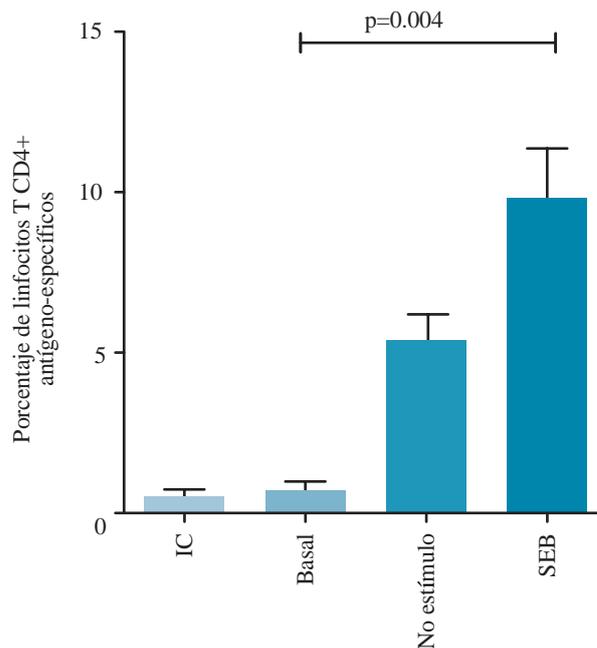


Figura 4: Expresión de CD154 en linfocitos T CD4+.

manera espontánea y 9.8% después de la estimulación con SEB (Figura 4).

En la Figura 4 se identifica el grado de expresión de CD154 en linfocitos T CD4+. Las células mononucleadas to-

tales fueron estimuladas durante 12 horas con la enterotoxina B del estafilococo en presencia del anticuerpo monoclonal anti-CD15-APC. Durante las últimas cuatro horas del cultivo se agregó brefeldina y monensina con la finalidad de inhibir la secreción de proteínas intracelulares (CD154). Después de 12 horas de estímulo, se cosecharon y se tiñeron las células con anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD3 y CD4. Las condiciones experimentales incluidas fueron: *IC*, control de isotipo; *basal*, células cultivadas durante 12 horas sin estímulo; *no estímulo*, células cultivadas en presencia de brefeldina y monensina; y *estímulo*, células cultivadas en presencia de la enterotoxina B del estafilococo, brefeldina y monensina. Las barras de error muestran la media \pm desviación estándar ($n = 5$).

CD107a y b se expresan en los linfocitos T CD8+ en respuesta a la enterotoxina B del estafilococo

Con la finalidad de identificar la capacidad funcional de degranulación y citotóxica de los linfocitos T CD8+ activados con enterotoxina B del estafilococo, se analizaron simultáneamente la pérdida de perforina intracelular y la expresión membranal de las moléculas CD107a y CD107b. Las células mononucleares palatinas fueron estimuladas durante cuatro horas con enterotoxina B en presencia de brefeldina y monensina (inhibidores de la secreción de proteínas). Después de la estimulación, las células se tiñeron con anticuerpos contra CD3, CD8, CD107a, CD107b y perforina. Los resultados indicaron que la expresión de CD107a y b se incrementa a partir de los 30 minutos de estimulación para alcanzar su máximo nivel a las cuatro horas. La expresión de CD107a y b mostró una relación inversa con la expresión de perforina intracelular. Estos resultados sugieren que los linfocitos T CD8+ son funcionales, se degranulan y pueden eliminar células infectadas (Figura 5).

Caracterización de células dendríticas de origen mieloide y plasmocitoide presentes en el tejido amigdalino

Las células dendríticas (CDs) participan en la respuesta inmunológica innata y adaptativa a través de una gran variedad de mecanismos. Su principal función es la presentación de antígenos a los linfocitos T; sin embargo, ésta puede variar según la localización de las células. En este trabajo se evaluó la frecuencia y el estado de activación de las dos poblaciones principales de células dendríticas, las mieloides y las plasmocitoides. La caracterización fenotípica de estas poblaciones se realizó con base en la expresión de los marcadores CD1a, CD1c, CD11b, CD11c, CD123 y HLA-DR. Los autores identificaron que en células mononucleadas

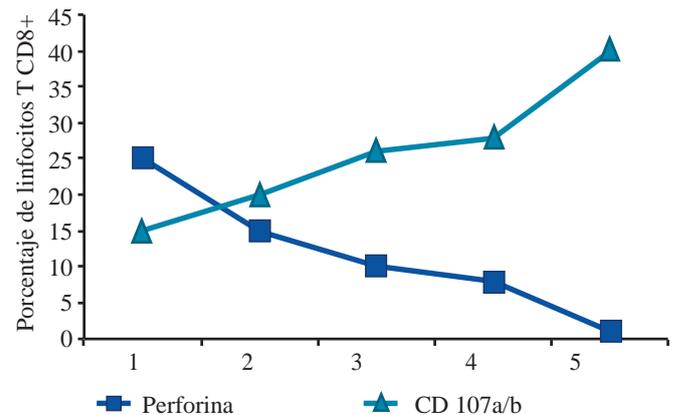


Figura 5. Capacidad de degranulación de linfocitos T CD8+ del tejido amigdalino. Las células mononucleadas fueron estimuladas con PMA/IO *in vitro* durante 4 h en presencia de brefeldina, monensina y anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD107a y b. Al final del tiempo de incubación las células fueron cosechadas, lavadas con PBS y permeabilizadas para la tinción de CD3, CD8 y perforina. Las barras de error muestran la media \pm desviación estándar. $N = 5$.

palatinas totales la frecuencia de células dendríticas mieloides (CD1a+CD11c+HLA-DR+) es de $1.39\% \pm 0.3$ y la de dendríticas plasmocitoides (CD1a+CD123+HLA-DR+) es de $0.19\% \pm 0.09$ (Figura 6).

En el análisis de las subpoblaciones de células dendríticas, como se observa en la Figura 6, se identificaron las células totales del tejido amigdalino a partir de una gráfica de puntos de dispersión frontal (FSC, *forward scatter*) vs dispersión lateral (SSC, *side scatter*). Se consideraron células dendríticas plasmocitoides las que coexpresaron el marcador CD123 y el antígeno de leucocitos humanos (*human leukocyte antigen*) HLA-DR, y como células dendríticas mieloides las que

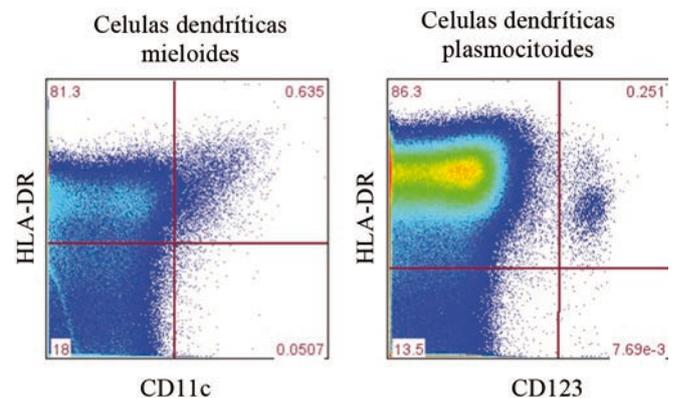


Figura 6. Análisis de las subpoblaciones de células dendríticas presentes en el tejido amigdalino.

coexpresaron el marcador CD11c y HLA-DR. Se muestra un experimento representativo.

En el Cuadro 5 se enlista la frecuencia total de cada una de las siguientes poblaciones: HLA-DR+, CD11b+, CD11c+, CD11b+CD11c-, CD11b+CD11c+ y CD11b-CD11c+; este análisis se llevó a cabo a partir de una ventana de células vivas como un control de las frecuencias de las subpoblaciones de células dendríticas estudiadas posteriormente. También se identificó que del total de las mieloides o convencionales, $23.1\% \pm 3.6$ corresponde a células CD11c+CD1a+HLA-DR+, las cuales se consideran precursores directos de las células dendríticas intersticiales.

En el Cuadro 6 se muestra el estado de activación de las diferentes poblaciones de este tipo de células con base en la expresión de los marcadores CD40, CD80, CD83 y CD86.

Cuadro 5. Subpoblaciones de células dendríticas identificadas en el tejido amigdalino

Población	Frecuencia (%)
CD1a+CD11c+HLA-DR+	$1.39\% \pm 0.3$
CD1a+CD123+HLA-DR+	$0.19\% \pm 0.09$

Cuadro 6. Análisis de marcadores de activación en CDm y CDp

Población	IMF (unidades arbitrarias)
Células dendríticas mieloides (CDm)	
CD40	158 (102-310)
CD80	328 (322-412)
CD83	581 (416-904)
CD86	320 (238-346)
Células dendríticas plasmocitoides (CDp)	
CD40	219 (162-367)
CD80	244 (138-405)
CD83	1,577 (709-3,109)
CD86	477 (350-848)

La cifras representan: mediana (mín-máx).

Discusión

El objetivo de este trabajo fue inmunofenotipificar las distintas poblaciones de células inmunológicas presentes en el tejido amigdalino de niños con indicación de amigdalectomía. Primero se estandarizó la metodología necesaria para la obtención de las células mononucleares a partir de tejido amigdalino, y posteriormente se midió la frecuencia de las principales poblaciones inmunológicas que participan en el desarrollo de la respuesta inmunitaria adaptativa (linfocitos

T totales, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos B totales, células dendríticas mieloides y células dendríticas plasmocitoides).

Las amígdalas palatinas son órganos linfoides secundarios que forman parte del sistema MALT y representan la acumulación más grande de tejido linfoide del anillo de Waldeyer. Las amígdalas son el principal órgano linfoide secundario al cual se puede tener acceso con facilidad, y frecuentemente se utilizan como fuente de un gran número de células. Las células mononucleares son aisladas por fragmentación del tejido amigdalino y después son purificadas en un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque. Como en todo órgano linfoide secundario, los linfocitos T y B son segregados en diferentes compartimentos anatómicos; los linfocitos B se agrupan en pequeñas estructuras llamadas folículos, localizadas en la periferia o corteza del órgano linfoide. Una vez que los linfocitos B presentes en el folículo han sido expuestos a un antígeno, este folículo desarrollará una región central llamada centro germinal, cuya principal función es la producción de anticuerpos. Los linfocitos T se localizan en zonas más periféricas pero adyacentes a los folículos, en la llamada paracorteza, en donde hay una gran cantidad de células dendríticas que le presentan antígenos a los linfocitos T. Esta ubicación depende principalmente de la expresión de los receptores para quimiocinas CXCR5 y CCR7.²⁶ Las células linfoides (linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y linfocitos B) en el tejido amigdalino se encuentran en estrecho contacto con una gran variedad de células dendríticas que forman parte del epitelio escamoso de la amígdala. Los autores midieron la frecuencia de linfocitos T CD3+ (18 ± 2.49), linfocitos T CD4+ (73.9 ± 8.3), linfocitos T CD8+ (14.7 ± 5.2) y linfocitos B totales (32.9 ± 11.3). El radio CD4:CD8 fue de 5.02, es decir, tres veces más alto de lo observado tradicionalmente en la sangre periférica. Aunque las amígdalas palatinas son una fuente rica de células del sistema inmunológico, también hay una gran cantidad de tejido conectivo que dificulta su recuperación; sin embargo, la frecuencia de linfocitos T CD3+ es semejante a la informada por otros autores, si bien el radio CD4:CD8 es superior al observado en la sangre periférica. Una posible explicación para este fenómeno es que una vez que un linfocito T CD4+ reconoce un antígeno presentado por una célula dendrítica, éste regula positivamente la expresión del receptor para quimiocinas CXCR5 y puede migrar al folículo en donde se localizan los linfocitos B. Al estar juntas estas dos células (linfocitos T CD4+ y linfocitos B) interactúan, haciendo que el linfocito T CD4+ madure y se diferencie en una célula T cooperadora folicular (*follicular helper cell*, T_{FH} cell). En este estadio, el linfocito B ya es apto para reconocer antígenos presentados por las células

dendríticas foliculares, por lo que podrá migrar a la periferia, en donde se diferenciará en un plasmablasto extrafolicular y dará origen a los linfocitos B de memoria, para después regresar al folículo, incrementar su proliferación y formar el centro germinal.^{27,28} Por esta razón, la existencia de un gran número de linfocitos T CD4+ en la amígdala palatina es fundamental para el desarrollo, diferenciación de los linfocitos B y producción de anticuerpos adecuados.

Desde el punto de vista inmunológico, la exposición a patógenos o a vacunas induce memoria inmunitaria, lo cual tiene como finalidad reducir la morbilidad del individuo. Este tipo de memoria se distingue por cambios en el número y distribución de los linfocitos con la finalidad de proveer mejor protección contra los patógenos. En las células, los cambios vinculados con la memoria inmunológica dependen de cambios epigenéticos en los linfocitos B y los linfocitos T para permitir una respuesta efectora mucho más rápida y eficiente. La memoria inmunológica en las células B es mediada por dos poblaciones principales: las células plasmáticas, responsables de la producción de anticuerpos (memoria efectora) y las células B de memoria (memoria central), las cuales funcionan como precursoras de las células plasmáticas.^{29,30} Los linfocitos B son producidos por la médula ósea a lo largo de la vida. Su desarrollo sigue dos fases que se manifiestan en distintos sitios: 1) la diferenciación de un precursor de linfocito B en un linfocito B virgen maduro a partir de una célula hematopoyética, que tiene lugar en la médula ósea; y 2) la maduración de estas células en células de memoria/efectoras en los órganos linfoides secundarios.^{31,32} Los linfocitos B maduros con receptor de células B (BCR) funcional dejan la médula ósea, llegan a la circulación periférica y recirculan entre los diferentes tejidos linfoides para morir en unos pocos días. Los linfocitos B vírgenes que reconozcan un antígeno en un órgano linfoide secundario iniciarán el desarrollo del centro germinal en colaboración con los linfocitos T CD4+_{FH}.^{28,33} Después de varios *rounds* de proliferación antígeno específica, estas células B generan linfocitos B de memoria y células B efectoras o plasmablastos. Los plasmablastos se establecen en órganos linfoides secundarios y terminan su diferenciación en células plasmáticas secretoras de anticuerpos.³⁴

En este trabajo se utilizaron los marcadores de superficie CD19, CD38, IgD y HLA-DR para clasificar a los linfocitos B en múltiples subpoblaciones de memoria llamadas Bm1-5: células vírgenes (Bm1: IgD+CD38-); células vírgenes activadas (Bm2: IgD+CD38+); células pre-GC (Bm2; IgD+CD38++); células GC (Bm3-centroblastos y Bm4-centrocitos, ambas son IgD-CD38++); y células de memoria (Bm5: IgD-CD38+/-).^{32,35} La principal función de estas poblaciones de linfocitos B de memoria es la producción de anticuerpos antígeno específicos de alta afinidad, así como su capacidad para

responder a una segunda exposición antigénica con mayor rapidez. Los linfocitos B vírgenes y los de memoria pueden circular en la sangre periférica; sin embargo, la mayor parte de los linfocitos B de memoria permanecen en el epitelio de la zona marginal del bazo y las amígdalas palatinas.³⁶

El desarrollo de memoria inmunológica para los linfocitos T es muy semejante al de los linfocitos B; comienza cuando el receptor del linfocito T (TCR) reconoce un complejo antígeno-MHC (*major histocompatibility complex*) en una célula presentadora de antígeno en un órgano linfoide secundario.^{37,38} Múltiples señales del receptor del linfocito T y las moléculas coestimuladoras favorecen la activación y diferenciación de éste en una célula efectora. El número de linfocitos T efectores alcanza su máximo en siete días, aproximadamente, y después muere 90% durante la fase de contracción inmunológica. En esta fase sólo sobreviven los linfocitos T de memoria.³⁹ Los linfocitos T de memoria son heterogéneos y se han descrito al menos cuatro subpoblaciones principales con base en el perfil de expresión de los marcadores CD45RA, CD62L y CCR7: linfocitos T vírgenes (CD45RA+CD62L+), linfocitos T de memoria central (T_{CM}) (CD45RA-CD62L+), linfocitos T de memoria efector (T_{EM}) (CD45RA-CD62L-) y linfocitos T de memoria efector que expresa CD45RA (T_{EMRA}) [CD45RA+CD62L-]. Los linfocitos T de memoria efectores expresan el receptor CCR7 que les permite migrar a otros tejidos durante la respuesta inmunológica inflamatoria, así como citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-5 y grandes cantidades de perforina.²⁹ Los linfocitos T_{CM} no producen citocinas, pero tienen gran capacidad proliferativa; expresan CCR7 y CD62L, por lo que también pueden migrar a otros tejidos. Algunos linfocitos T_{EMRA} igualmente expresan perforina, pero su capacidad para proliferar es todavía más limitada; de hecho, se ha propuesto que esta subpoblación se genera en respuesta a la proliferación homeostática más que a la proliferación mediada por estimulación antigénica.⁴⁰ En este trabajo se identificaron las cuatro poblaciones de linfocitos T de memoria en el tejido amigdalino. Los linfocitos T_{CM} predominan en el compartimento CD4+, mientras que los linfocitos T vírgenes abundan en el compartimento CD8+. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ desempeñan funciones distintas en los órganos linfoides secundarios, lo que puede ser una de las razones por las que se identificó un porcentaje distinto de células de memoria entre ambas poblaciones de linfocitos T.

A continuación nos propusimos evaluar la capacidad funcional de los linfocitos T CD4+ y CD8+ mediante dos ensayos funcionales. Primero, se midió la frecuencia de linfocitos T CD4+ antígeno específicos, y posteriormente se evaluó la capacidad citotóxica de los linfocitos T CD8+. CD154 es un marcador de activación que se expresa tran-

sitoriamente en la superficie de los linfocitos T CD4+ que han sido activados vía TCR.⁴¹ El análisis de este marcador permite identificar una subpoblación de linfocitos T CD4+ antígeno específicos aun cuando su capacidad para producir citocinas sea limitada. Este ensayo sólo se había realizado en células mononucleadas de sangre periférica; ésta es la primera vez que intencionadamente se utiliza para medir la frecuencia de linfocitos T CD4+ antígeno específicos en el tejido amigdalino. Estos resultados mostraron que 5.3% de los linfocitos T CD4+ expresan CD154 de manera espontánea y 9.8% después de cuatro horas de estimulación del receptor del linfocito T con enterotoxina B del estafilococo. La medición de la expresión de CD154 en la superficie del linfocito T CD4+ es realmente confiable cuando se compara con la de otros marcadores de activación, como CD69, debido a que la expresión de este último marcador puede verse influida por las citocinas presentes en el medio de cultivo, fenómeno que no sucede al medir CD154. Este ensayo realizado en células mononucleares palatinas demuestra que, de manera basal, 5.3% de los linfocitos T CD4+ expresa CD154, y este porcentaje se incrementa después de la estimulación. La expresión de CD154 en el linfocito T_{FH} es importante, ya que favorece el desarrollo de los centros germinales y la producción de distintos isotipos de anticuerpos por los linfocitos B.^{42,43} Se ha propuesto que los linfocitos T CD4+ en el centro germinal migran a la zona parafolicular para estar en estrecho contacto con los linfocitos B. La interacción dependiente de CD154 que ocurre entre los linfocitos T y B estimula la proliferación inicial de estos últimos, favoreciendo su posterior diferenciación en plasmablastos y células plasmáticas productoras de anticuerpos.⁴³ Se considera que con este tipo de ensayo pueden identificarse linfocitos T CD4+ que cooperan con los linfocitos B para la adecuada producción de anticuerpos, así como linfocitos T CD4+ antígeno específicos. Esta información es relevante, puesto que las células mononucleares palatinas pueden utilizarse para otro tipo de ensayos funcionales en los que se evalúe la respuesta inmunológica adaptativa.

Otra de las poblaciones de linfocitos T que participa directamente en la respuesta inmunológica adaptativa es la de los linfocitos T CD8+. Los linfocitos T CD8+ tienen dos funciones principales una vez que han reconocido un antígeno específico: producir factores solubles (citocinas y quimiocinas) y mediar la muerte de las células blanco (células infectadas o transformadas). Los linfocitos T citotóxicos eliminan a las células blanco a través de dos vías principales: la dependiente de gránulos (perforina y granzimas) y la independiente de gránulos (Fas-Fas ligando).⁴⁴ La vía dependiente de gránulos no requiere la síntesis *de novo* de las proteínas efectoras, ya que éstas se encuentran almacenadas en gránulos líticos localizados en el citoplasma.⁴⁴ Los gránulos líticos

son lisosomas complejos que expresan en la membrana algunas glucoproteínas como CD107a (LAMP-1), CD107b (LAMP-2) y CD63 (LAMP-3). Estas proteínas no se expresan normalmente en la superficie de los linfocitos T CD8+; sin embargo, sí pueden identificarse mediante citometría de flujo cuando los linfocitos son estimulados con ionomicina.⁴⁵ Una vez que el linfocito T CD8+ ha sido activado y los gránulos líticos alcanzan la membrana plasmática para fusionarse con ella y liberar su contenido, puede medirse transitoriamente la expresión de CD107a y b. En este ensayo de degranulación se observó que 30 minutos después de la estimulación de las células mononucleares palatinas, los linfocitos T CD8+ expresaron CD107a/b, alcanzando un máximo a las cuatro horas. La expresión de estas moléculas en la membrana plasmática de los linfocitos T CD8+ mostró una relación inversa con la expresión de perforina intracelular, esto es, a mayor expresión de CD107a/b en la superficie, menor es la expresión de perforina intracelular. Estos resultados demuestran claramente que los linfocitos T CD8+ de la amígdala palatina son funcionales, ya que responden a la activación *in vitro* y tienen una adecuada capacidad de degranulación y, por tanto, de eliminar células infectadas por patógenos o células transformadas.

Por último, se estudiaron las células dendríticas del tejido amigdalino. Este tipo de células se encuentra en prácticamente todas las áreas del cuerpo, como: piel, faringe, esófago superior, vagina y también en las superficies mucosas, como la vía aérea superior y el sistema digestivo.⁴⁶ Participan directamente en la respuesta inmunológica adaptativa, ya que su principal función es la presentación de antígenos a los linfocitos T.⁴⁷ Una vez que una célula dendrítica ha reconocido un antígeno, incrementa la expresión de algunos marcadores de activación como CD40, CD80, CD83 y CD86, además de que produce citocinas como IL-12.^{48,49}

En este trabajo, se estudiaron primero dos distintas poblaciones de células dendríticas, las mieloides (mDC) [CD11c+] y las plasmocitoides (pDC) [CD123+], y posteriormente se evaluó su estado de activación con base en la expresión de los marcadores CD40, CD80, CD83 y CD86. Los resultados demuestran que en el tejido amigdalino hay 1.39% de células mieloides y 0.19% de células plasmocitoides. Las primeras son células que producen IL-12 e IFN- γ en respuesta a estímulos microbianos y, por tanto, favorecen el desarrollo de una reacción inmunológica de tipo TH1, mientras que las plasmocitoides producen IFN- α , β y ω en respuesta a infecciones de origen viral. Ambos tipos de células dendríticas median resistencia a las infecciones una vez que han internalizado a un patógeno (bacteria o virus); se activan, maduran y presentan antígenos a los linfocitos T para iniciar la respuesta inmunológica adaptativa. En este estudio se encontró mayor

expresión de marcadores de activación en la subpoblación de células plasmocitoides. Es posible que este resultado sea consecuencia de la mayor frecuencia de infecciones de vías aéreas superiores de origen viral ocurridas durante la infancia. Se desconoce si puede identificarse un perfil de activación distinto en amígdalas no hipertróficas o sin antecedentes de faringoamigdalitis de repetición.

En este estudio se demostró que los linfocitos T y las células dendríticas del tejido amigdalino son funcionales a pesar de haber cambios microscópicos específicos en las criptas amigdalinas, producto de una amigdalitis crónica por cuadros de faringoamigdalitis de repetición. Esto hizo que se reevaluara la posición de los autores expresada en la hipótesis, en la que se presuponía que, debido a una inadecuada estimulación antigénica ocasionada por los cambios crónicos ya descritos, la funcionalidad de las células estudiadas podría verse alterada. En algunos estudios se refiere que hay una modificación cuantitativa en las subpoblaciones de linfocitos T y B que, junto con los cambios crónicos en el epitelio reticular amigdalino, sugiere anomalías en la capacidad funcional final del tejido amigdalino crónicamente estimulado; sin embargo, en este estudio se comprueba de forma objetiva que tal disfuncionalidad no existe. Los resultados obtenidos son de suma importancia, puesto que no hay estudios previos en los que se demuestre objetivamente dicho estado funcional de los linfocitos T CD4+, CD8+ y CD5 en un órgano linfoide secundario tan rico como las amígdalas.

Existen criterios clínicos específicos, además de que se busca evitar comorbilidades a largo plazo, para pacientes que sí son aptos y necesitan un tratamiento quirúrgico para mejorar su nivel de vida. En estos casos, el retiro de un tejido inmunológicamente activo y funcional no implica que se condenará al paciente a un estado de inmunodeficiencia crónica, puesto que existen centros inmunológicos en otras áreas del cuerpo que pueden soportar los embates antigénicos y proveer una respuesta inmunitaria adecuada y suficiente.

Conclusiones

Los linfocitos T y las células dendríticas son funcionales en el tejido amigdalino a pesar de existir una estimulación crónica ocasionada por cuadros de faringoamigdalitis de repetición. Contrario a lo que se ha informado en la bibliografía y en nuestra hipótesis rechazamos que se trate de un tejido disfuncional en mayor o menor grado.

Referencias

- Cummings CFP, Harker L, Haughey B, et al. Cummings otolaryngology head and neck surgery. Saint Louis: Elsevier Mosby, 2005.
- Bailey BJJ. Head and neck surgery otolaryngology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- Oykhman P, Mody CH. Direct microbicidal activity of cytotoxic T-lymphocytes. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:249482.
- Dorner T, Radbruch A. Antibodies and B cell memory in viral immunity. *Immunity* 2007;27:384-392.
- Figdor CG. Molecular characterization of dendritic cells operating at the interface of innate or acquired immunity. *Pathol Biol* 2003;51:61-63.
- El-Serag HB, Hepworth EJ, Lee P, Sonnenberg A. Gastroesophageal reflux disease is a risk factor for laryngeal and pharyngeal cancer. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2013-2018.
- Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2004;83:1-1438.
- Brandtzaeg P, Surjan L, Berdal P. Immunoglobulin systems of human tonsils. I. Control subjects of various ages: Quantification of Ig-producing cells, tonsillar morphometry and serum Ig concentrations. *Clin Exp Immunol* 1978;31:367-381.
- Brandtzaeg P. Immune functions and immunopathology of palatine and nasopharyngeal tonsils. In: Bernstein JM, Ogra PL, editors. *Immunology of the ear*. New York: Raven Press, 1987;63-106.
- Lieberman J. The abcs of granule-mediated cytotoxicity: New weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003;3:361-370.
- Ejzenberg. Diagnosis and management of chronic tonsillitis. *V IAPO Manual of Pediatric Otorhinolaryngology* 2005:100-105.
- Baugh RF, Archer SM, Mitchell RB, Rosenfeld RM, et al. Clinical practice guideline: Tonsillectomy in children. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2011;144:S1-30.
- Cantani A, Bellioni P, Salvinelli F, Businco L. Serum immunoglobulins and secretory IgA deficiency in tonsillectomized children. *Ann Allergy* 1986;57:413-416.
- Boyaka PN, Wright PF, Marinaro M, Kiyono H, et al. Human nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissues. Functional analysis of subepithelial and intraepithelial B and T cells from adenoids and tonsils. *Am J Pathol* 2000;157:2023-2035.
- Ikinciogullari A, Dogu F, Egin Y, Babacan E. Is immune system influenced by adenotonsillectomy in children? *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2002;66:251-257.
- Cullen KA, Hall MJ, Golosinskiy A. Ambulatory surgery in the United States, 2006. *Natl Health Stat Report* 2009:1-25.
- Younis RT, Lazar RH. History and current practice of tonsillectomy. *Laryngoscope* 2002;112:3-5.
- Paradise JL, Bluestone CD, Bachman RZ, Karantonis RZ, et al. History of recurrent sore throat as an indication for tonsillectomy. Predictive limitations of histories that are undocumented. *N Engl J Med* 1978;298:409-413.
- Brodsky L. Modern assessment of tonsils and adenoids. *Pediatr Clin North Am* 1989;36:1551-1569.

20. Capdevila OS, Kheirandish-Gozal L, Dayyat E, Gozal D. Pediatric obstructive sleep apnea: Complications, management, and long-term outcomes. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:274-282.
21. Ali NJ, Pitson DJ, Stradling JR. Snoring, sleep disturbance, and behaviour in 4-5 year olds. *Arch Dis Child* 1993;68:360-366.
22. Brunetti L, Rana S, Lospalluti ML, et al. Prevalence of obstructive sleep apnea syndrome in a cohort of 1,207 children of Southern Italy. *Chest* 2001;120:1930-1935.
23. Muzumdar H, Arens R. Diagnostic issues in pediatric obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:263-273.
24. Gozal D, O'Brien LM. Snoring and obstructive sleep apnoea in children: Why should we treat? *Paediatr Respir Rev* 2004;5 Suppl A:S371-376.
25. Lipton AJ, Gozal D. Treatment of obstructive sleep apnea in children: Do we really know how? *Sleep Med Rev* 2003;7:61-80.
26. Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 2005;23:127-159.
27. Nutt SL, Tarlinton DM. Germinal center B and follicular helper T cells: Siblings, cousins or just good friends? *Nat Immunol* 2011;12:472-477.
28. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 2007;27:190-202.
29. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: Function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004;22:745-763.
30. Dorner T, Radbruch A. Selecting B cells and plasma cells to memory. *J Exp Med* 2005;201:497-499.
31. McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* 2005;23:487-513.
32. Pascual V, Liu YJ, Magalski A, de Bouteiller O, et al. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med* 1994;180:329-339.
33. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 2006;6:107-116.
34. Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, et al. Competence and competition: The challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol* 2006;6:741-750.
35. Grammer AC, McFarland RD, Heaney J, Darnell BF, Lipsky PE. Expression, regulation, and function of B cell-expressed cd154 in germinal centers. *J Immunol* 1999;163:4150-4159.
36. Tangye SG, Tarlinton DM. Memory B cells: Effectors of long-lived immune responses. *Eur J Immunol* 2009;39:2065-2075.
37. Davis MM. T cell receptor gene diversity and selection. *Annu Rev Biochem* 1990;59:475-496.
38. Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL, et al. *In vivo* activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol* 2001;19:23-45.
39. Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol* 2003;4:835-842.
40. Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* 2003;101:4260-4266.
41. Frensch M, Arbach O, Kirchhoff D, Moewes B, et al. Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med* 2005;11:1118-1124.
42. Elzey BD, Grant JF, Sinn HW, Nieswandt B, et al. Cooperation between platelet-derived CD154 and CD4+ T cells for enhanced germinal center formation. *J Leukoc Biol* 2005;78:80-84.
43. Wolniak KL, Shinall SM, Waldschmidt TJ. The germinal center response. *Crit Rev Immunol* 2004;24:39-65.
44. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002;2:735-747.
45. Kannan K, Stewart RM, Bounds W, Carlsson SR, et al. Lysosome-associated membrane proteins h-LAMP1 (CD107a) and h-LAMP2 (CD107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium. *Cell Immunol* 1996;171:10-19.
46. Lindquist RL, Shakhar G, Dudziak D, et al. Visualizing dendritic cell networks *in vivo*. *Nat Immunol* 2004;5:1243-1250.
47. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007;449:419-426.
48. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997;388:782-787.
49. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1995;154:5071-5079.