

## ACCION "IN VITRO" DE LAS HORMONAS TIMICAS SOBRE FUNCIONES INMUNOLOGICAS CELULARES EN UN CASO DE INMUNODEFICIENCIA DE CELULAS T COOPERADAS

\* Mauricio Frajman y Luis González

### RESUMEN

Se presenta un caso de inmunodeficiencia primaria ligada al cromosoma X en un niño de un año de edad, con niveles bajos de linfocitos T circulares (2%).

Se encontró alterada la función de los linfocitos T cooperadores así como otras funciones inmunológicas relacionadas con ellos, las cuales se vieron mejoradas con el tratamiento con hormona tímica in vitro. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1987; 8(4):211-215].

### INTRODUCCION

La inmunodeficiencia primaria de células T cooperadoras ligada al cromosoma X es una enfermedad sumamente rara. En la mayoría de los casos, es el resultado de un defecto en la diferenciación de las células tronco (1), aunque, algunos autores han encontrado en el timo de estos pacientes, alteraciones similares a la inmunodeficiencia celular que se describe en el Síndrome de Nezeloff (6).

Para efectos clínicos, sin embargo, deben realizarse estudios más detallados que lleven a establecer el nivel exacto del defecto, y que permitan diferenciarlo de otras inmunodeficiencias primarias.

### PRESENTACION DEL CASO:

Un niño de un año de edad, con antecedentes de dos hermanos fallecidos varios años antes, por una de inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X, fue admitido al Hospital Nacional de Niños de Costa Rica. Al ingreso presentó diarrea severa y una historia de infecciones pulmonares e intestinales a repetición.

---

Unidad de Inmunología, Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA), Tres Ríos, Costa Rica.

\* Jefe Unidad de Inmunología, INCIENSA, Apdo. 4, Tres Ríos, Costa Rica.

Los exámenes de laboratorio demostraron la presencia de hipogamaglobulemia y anemia, y una cifra normal de leucocitos en sangre periférica.

Para los estudios de inmunidad celular se tomó del niño una muestra de sangre periférica anticoagulada con heparina (10UI/ml de sangre). Las células mononucleares (CMN) fueron obtenidas por estratificación en gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma) lavadas 3 veces en solución balanceada de Hank y resuspendidas en medio RPMI-1640 suplementado con 2mM de L-Glutamina, 10 por ciento de suero fetal bovino, 100 IU por ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomycin (todos de Grand Island Biological, New York). Las células fueron contadas y su viabilidad determinada con tinción por exclusión con azul tripán.

Las células B fueron identificadas por la presencia de inmunoglobulina de superficie usando suero de cabra anti-inmunoglobulina humana conjugada con fluoresceína (6).

Los linfocitos T fueron cuantificados por su capacidad de formar rosetas con eritrocitos de carnero (rosetas E).

Las pruebas de transformación blástica se hicieron por triplicado en placas de microcultivos de fondo en U (Labortecnick) cultivando  $10^5$  células por pozo con concentraciones óptimas de mitógenos: Fitoheماغlutinina (PHA), Concanavalina-A (Con A) y Fitolaca Americana (PWM) por 72 horas, dieciocho horas antes de cosechar las células se agregó 0.5 uCi de 3H-Timidina. La incorporación del radioisótopo fue cuantificada en un contador de centelleo (Beckman).

Los cultivos mixtos de linfocitos (autólogo y heterólogo) se montarán de acuerdo a las técnicas previamente descritas (10).

La determinación de la respuesta y producción de Interleucina 2 (IL-2) se siguió el procedimiento ya descrito (9) estimulando las células mononucleares (CMN) por 72 horas con PHA, y posteriormente, 78 horas con IL-2, y midiendo la proliferación por la incorporación de 3H-Timidina.

La actividad de citotoxicidad natural se evaluó cuantificando la inhibición de la incorporación de timidina tritiada a las células K-562 como células blanco, de acuerdo al método de Huttunen e Ilonen (5).

En todas las pruebas, se utilizó como control las células mononucleares de un individuo normal, procesadas en condiciones idénticas a la muestra del paciente; en ambos se realizaron las pruebas con y sin hormona tímica (Sigma) en dosis previamente establecidas (2).

Del total de células mononucleares aisladas en gradiente de Ficoll Hypaque, 65 por ciento eran células B con una proporción normal de los distintos tipos de Ig de superficie. Solamente el 2 por ciento de las CMN formaron rosetas con eritrocitos de carnero. Los resultados de los cultivos mixtos linfocitarios se pueden observar en la figura 1.

No detectamos actividad citotóxica natural (NK) ni tampoco producción de interleucina 2 (IL-2) con las células del paciente.

Los resultados de la transformación blástica de los linfocitos se presentan en la Figura 2.

Al agregar hormona tímica a los distintos estudios, pudimos observar que la actividad NK llegó a 9 por ciento y la producción de IL-2 alcanzó un 75 por ciento de lo observado en los controles normales.

En las figuras 1 y 2 se observa el efecto de estas hormonas sobre los demás parámetros.

## DISCUSION

La interleucina 2 es un factor soluble, producido por linfocitos T, OKT4 +, aglutinina de maní (+) y con capacidad de formar rosetas con eritrocitos autólogos (1). La IL-2 tiene un papel fundamental en la diferenciación y mantenimiento en cultivo de linfocitos T (7), además es un factor necesario en la activación de células NK (3).

Recientemente se ha reportado que la IL-2 corrigió algunas de las disfunciones inmunológicas de las células de un paciente con inmunodeficiencia selectiva OKT4, en un caso semejante al nuestro con ausencia de marcadores de superficie de células T cooperadoras (11).

La RMLA es una reacción que posee especificidad inmunológica, de memoria (4) y se caracteriza por la estimulación de los linfocitos T y por el autoreconocimiento de las células que portan en su superficie los antígenos HLA de clase II. Por otro lado, las transformaciones blásticas mitogénicas son muy útiles para evaluar en parte las funciones linfocitarias.

En nuestro caso, todos estos parámetros se mostraron defectuosos debido a la deficiencia de células T cooperadoras, con la observación de que tales defectos pudieron ser parcialmente corregidos "in vitro" con la adición de hormona tímica.

Los datos confirman que la hormona tímica juega un papel primordial en los circuitos de inmunoregulación y que puede ser de importancia en la comprensión y tratamiento de inmunodeficiencia dependientes de células T.

## ABSTRACT

*Thymic hormones correct "in vitro" T-cell functions in a patient with T-helper cell deficiency.*

*A case of X-linked primary immunodeficiency in an one-year-old boy with a history of repeated lung and enteric infections is presented.*

*The patient presented hypogammaglobulinemia, with a normal peripheral blood leucocytes count. Sixty five per cent of the lymphocytes were B-cells, only 2 percent of the mononuclear were sheep-erythrocyte rosette-forming-cells. The patient's lymphocytes did not respond to optimally-mitogenic concentration of PHA, con-A and PWM. The mixed lymphocyte culture was normal, however no autologous mixed lymphocyte response was obtained.*

*Natural killer activity as well as interleukin-2 production were absent.*

*When thymic hormones were added to the different cultures, there was a significant improve in all parameters.*

*The data confirms that thymic hormones play a critical role in the immunoregulatory circuits and may be of importance in the understanding and treatment of T cell deficiency.*

## BIBLIOGRAFIA

1. Alarcón-Segovia, D. Interleukin-2 autoimmunity, on records, hypothesis, theories and facts. J. Rheumatol., 1983, 10:159-160.
2. Bach, J.F. Dardenne, M., Pleau, J.M. Biochemical Characterization of serum thymic factor. Nature 1977, 266:55-57.
3. Flomemberg, N., Welte, K., Mertelsman, R., O'Reilly, R., Supont, B. Interleukin-2 dependent natural killer cells lines from patients with primary Tcell immunodeficiencies. J. Immunol., 1983; 130:2635-2643.

4. Hausman, P., Stobo, J.O. Specificity and function of a human autologous reactive T cell. *J. Exp. Med.* 1979; 149:1537-1542.
5. Huttunen, K., Ilonen, J. The determination of NK activity of human peripheral blood lymphocytes by measuring the DNA-synthesis of proliferating target cells (K 562 cell line) *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand.* 1983, 91:197-201.
6. Lawlor, J.G. The syndrome of cellular immunodeficiency with immunoglobulins. *J. Pediatr.* 1974; 84:183-186.
7. Reinherz, E.L., Schlossman, S.F. The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell* 1980; 19:821-827.
8. Rosen, F.S., Janeway, C.A. The gammaglobulins. 3. The antibody deficiency syndromes. *New. Engl. J. Med.* 1966; 275:709-713.
9. Ruscetti, F., Gallo, R. Human T lymphocyte growth factor; regulation growth and function of T lymphocytes. *Blood* 1981, 57:379-394.
10. Sakane, T., Green, I. Specificity and suppressor function of T cells responsive to autologous non T-cells. *J. Immunol.* 1979, 123:584-589.
11. Tsuchiya, S., Imaizumi, M., Minegishi, M., Konno, T., Tada, K. Lack of Interleukin-2 production in a patient with OKT4 + T-cell deficiency. *NEJM* 1983; 308:1294 (Letter).

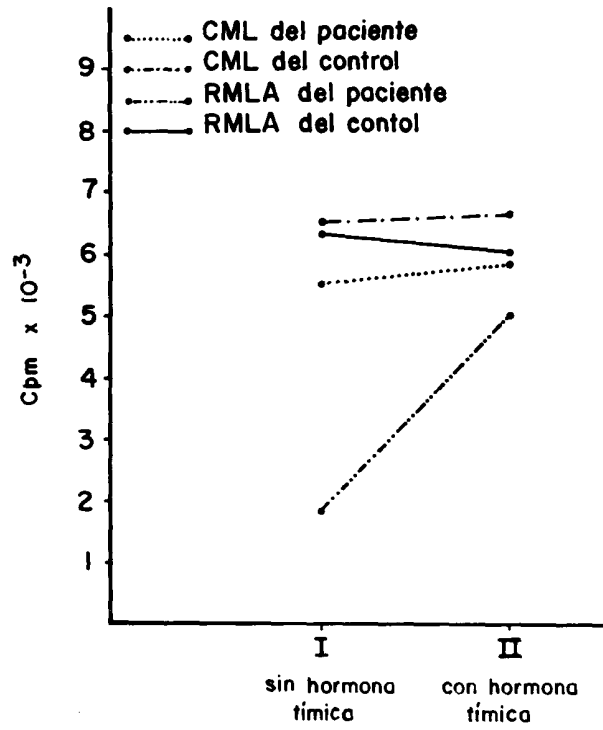


FIG. 1: Cultivo mixto linfocitarjo (CML) y respuesta mixta linfocitaria autóloga (RMLA) (Respuesta mixta linfocitaria autóloga) de las células del paciente y de su control sin y con hormona tímica.

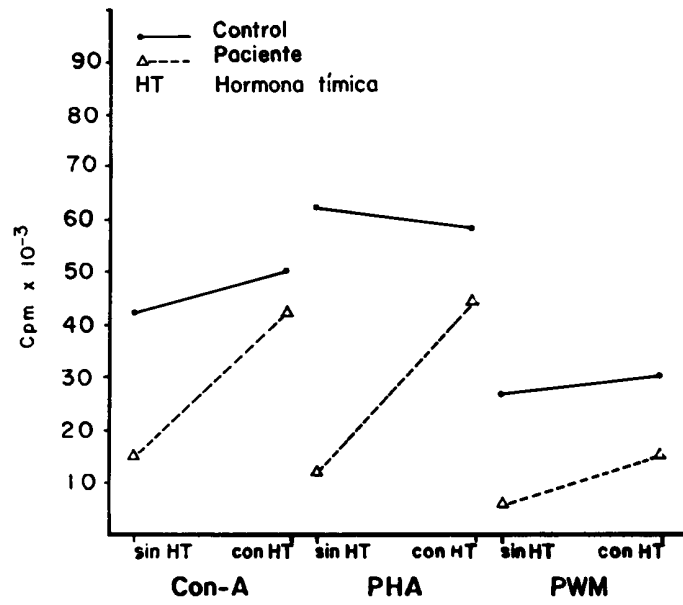


FIG. 2: Estimulación blástica de la CMN del paciente y del control con y sin hormona tiroidea utilizando los mitógenos concanavatina-A (con-A) fitohemaglutinina (PHA) y fitolaca americana (PWM).