

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CNIC).
CIUDAD DE LA HABANA, CUBA

Curva dosis-respuesta de los linfocitos a la fitohemaglutinina en niños sanos

Por el Dr.:

CARLOS A. GARCIA SANTANA*

García Santana, C. A. *Curva dosis-respuesta de los linfocitos a la fitohemaglutinina en niños sanos.* Rev Cub Ped 52: 5, 1980.

Una de las pruebas más utilizadas para determinar la inmunidad celular es la transformación blástica de los linfocitos, cuando son estimulados con fitohemaglutinina (FHA). Algunos autores sugieren el empleo de varias dosis crecientes del mitógeno para mejorar la interpretación de los resultados en el diagnóstico clínico, ya que permitiría detectar estados de inmunodeficiencias que podrían ser enmascarados por una dosis única de FHA de estimulación máxima. Como la curva dosis-respuesta a la FHA parece ser una prueba de transformación blástica más completa que la estimulación única, nosotros hemos estudiado a un grupo de niños sanos, con el propósito de obtener un patrón de referencia de respuesta inmunológica mediada por células. Se estudiaron 27 niños sanos, cuyas edades oscilaron entre 4 meses y 5 años. Se purificaron los linfocitos de sangre periférica por el método de centrifugación en gradiente de densidad. Se cultivaron los linfocitos y se estimularon 1,5 µg, 12,5 µg, 50 µg, 200 µg de FHA y se hizo un control sin estimular. Se incubaron durante 68 horas y se le dio un pulso con timidina tritlada de 4 horas. Posteriormente se lavaron y deshidrataron las muestras para ser leídas en un contador de centelleo líquido. Los resultados obtenidos son compatibles con las curvas informadas por otros autores.

INTRODUCCION

La fitohemaglutinina (FHA) es un derivado del *Phaseolus vulgaris*, que cuando no se encuentra en forma agregada¹ es capaz de estimular sólo a los linfocitos causantes de la respuesta celular o linfocitos timodependientes, produciendo la síntesis de DNA y la proliferación,² proceso durante el cual se producen cambios morfológicos y bioquímicos que se conocen con el nombre de transformación blástica.³ No se conoce perfec-

tamente el mecanismo de acción de la FHA sobre los linfocitos y no se ha podido correlacionar con la hipersensibilidad retardada, no obstante se ha observado cierta correlación entre las funciones de los linfocitos timodependientes y la capacidad de respuesta *in vitro* de los linfocitos de sangre periférica estimulados con FHA⁴ y esta respuesta se encuentra deprimida en ciertos estados de inmunodeficiencias.⁴⁻⁷ Por esta razón la transformación blástica de los linfocitos inducida por la FHA ha tenido una aceptación amplia para medir la capacidad general de respuesta de los linfocitos timodependientes.

* Médico inmunólogo del laboratorio de inmunología del CNIC. Apartado 6880, Ciudad de La Habana, Cuba.

En la mayoría de los estudios realizados se utiliza una dosis única de FHA, que en general es la dosis máxima de estimulación, la cual no parece brindar una información completa para poder definir la respuesta normal de los linfocitos a la FHA, porque se ha encontrado que esta respuesta tiene variaciones grandes entre los individuos sanos.⁸⁻¹¹ Por este motivo varios autores han sugerido que para una mejor valoración de los resultados se debe utilizar dosis crecientes del mitógeno, ya que brinda un perfil más apropiado de la respuesta de los linfocitos a la FHA.¹²⁻¹⁴

El propósito del presente trabajo ha sido el de obtener la curva dosis-respuesta a la FHA de los linfocitos de un grupo de niños sanos.

MATERIAL Y METODO

Se estudiaron 27 niños sanos cuyas edades oscilaron entre 4 meses y 5 años; estos niños fueron seleccionados de las consultas de puericultura de los policlínicos "Carlos J. Finlay" y "Elpidio Berovides" de Marianao, durante el chequeo médico que se les realizó previamente a los niños a su ingreso en los círculos infantiles. Se tomaron de 4-5 ml de sangre venosa y se les añadió 50 U de heparina (Heparine Choay, Lab. Choay) por ml de sangre. Se purificaron los linfocitos mediante centrifugación en gradiente de densidad con verografin al 15%. Se lavaron 3 veces con medio Parker y se les hizo conteo y viabilidad con azul de tripano. Se cultivaron en cada tubo 2×10^5 células vivas en 0,7 ml de medio Parker suplementado con 15% de suero de donantes con grupo sanguí-

neo AB, 100 μ g de estreptomycin/ml y 100 U de penicilina/ml.

A cada individuo se le hicieron 5 determinaciones por duplicado, a las cuales se les añadió respectivamente 0; 1,5; 12,5; 50 y 200 μ g de fitohemaglutinina M (Difco Lab.). Se cultivaron a 37°C en atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO₂, durante 68 horas, al cabo de las cuales se les dio un pulso de 4 horas con 2 microCi de timidina tritiada (Amersham). Se detuvo el pulso mediante enfriamiento a 4°C y se lavó 2 veces con solución salina amortiguada con fosfato a pH 7,2. A cada tubo se le añadió una gota de suero y 2 ml de ácido tricloroacético (ATC) al 10% y se dejaron toda la noche a 4°C. Se lavaron una vez más con ATC al 10% y dos veces con metanol. Se les añadió 0,2 ml de hidróxido de hiamina y se pusieron a 70-80°C hasta que se disolvió el precipitado. Se pasaron a los viales de centelleo mediante 2 volúmenes de 5 ml de líquido de centelleo (0,3 g de POPOP, 5 g de PPO/litro de tolueno) y se leyeron en un espectrómetro de centelleo líquido.

Los resultados obtenidos en conteos por minutos siguen una distribución log-normal.¹⁵ Para una mayor facilidad en el cálculo de los estadígrafos de cada dosis se desarrolló en el departamento de matemáticas del CNIC un programa en Leal-F para una computadora de propósitos generales CID-201 B.

RESULTADOS

Los resultados se resumen en el cuadro y los gráficos 1 y 2. En el gráfico 1

CUADRO

VALORES EN CONTEOS POR MINUTO (CPM) OBTENIDOS CON LAS DIFERENTES DOSIS DE FITOHEMAGLUTININA

	Dosis de fitohemaglutinina (μ)				
	0	1,5	12,5	50	200
Medias	201	424	3 022	19 052	18 083
Medias + 2 DS	302	635	4 886	33 350	32 213
Medias - 2 DS	133	282	1 869	10 883	10 151
DS	2,89	2,86	3,48	4,28	4,48
Indice de transformación	—	2,1	15	94	89

Gráfico 1

TRANSFORMACION DE LOS LINFOCITOS EN RESPUESTA A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FITOHEMAGLUTININA (LA DOSIS O ESTA REPRESENTADA EN 0,3 μ g).

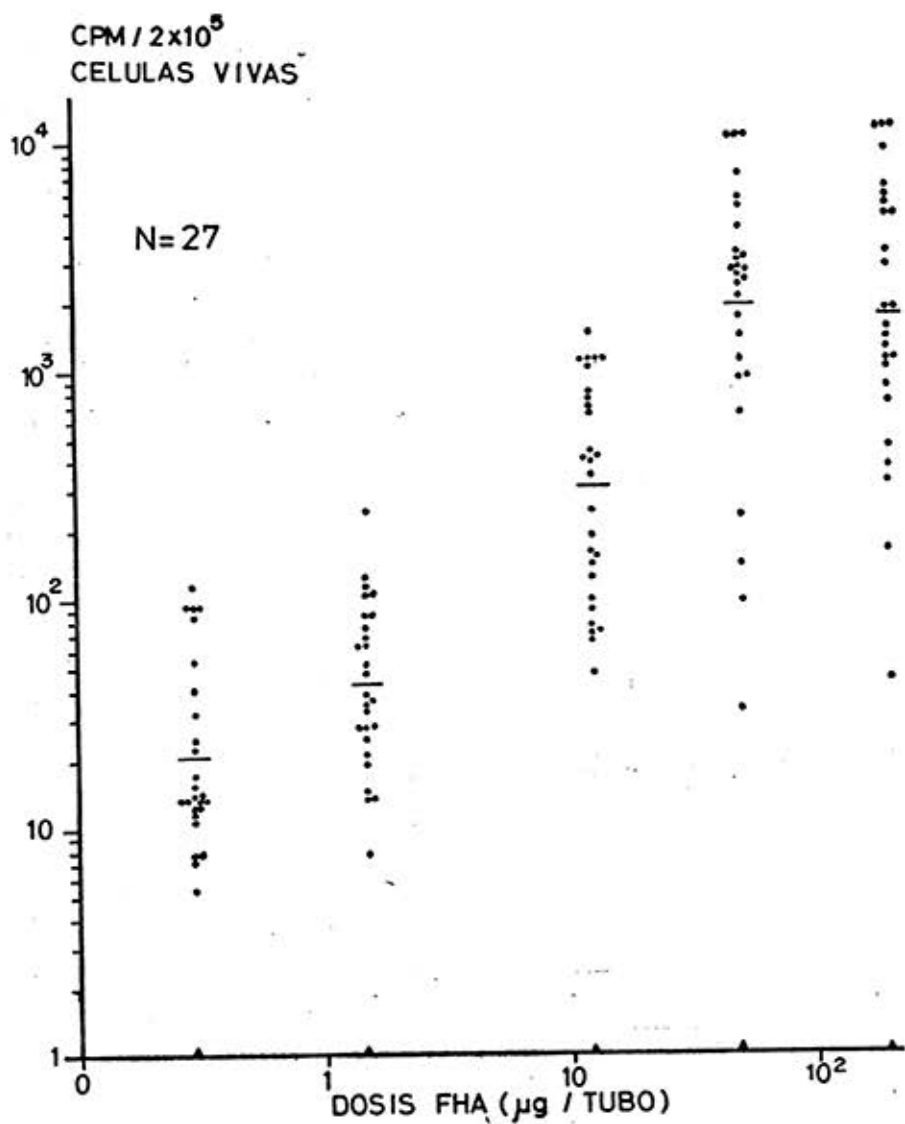
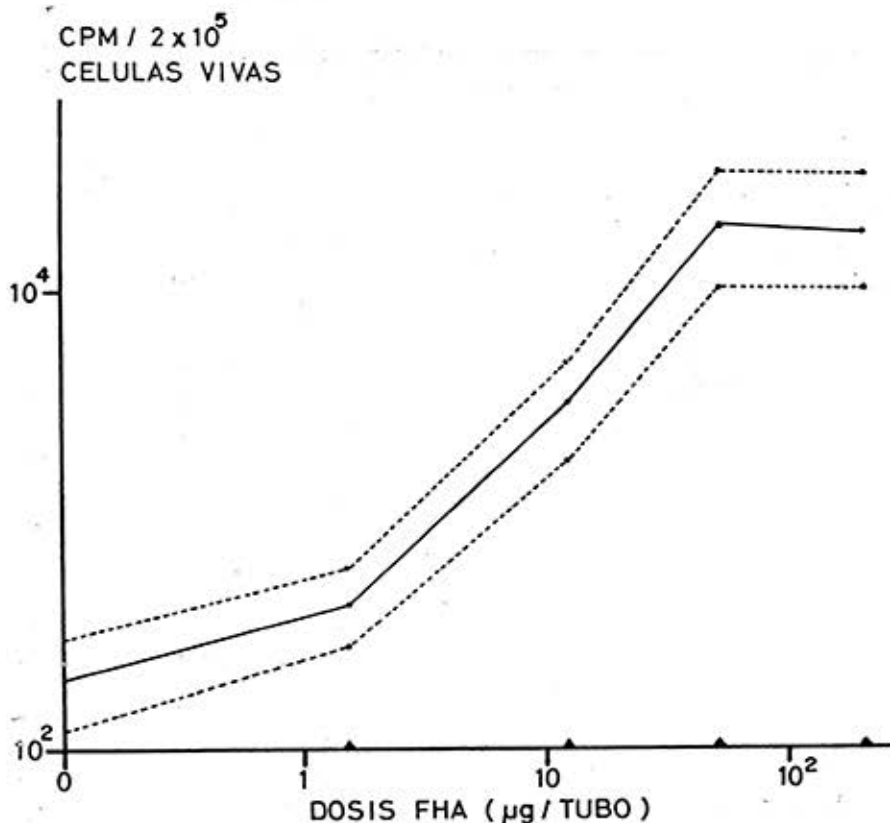


Gráfico 2

CURVA DOSIS-RESPUESTA A LA FITOHEMAGLUTININA OBTENIDA EN LOS NIÑOS ESTUDIADOS



se observa la distribución de los valores promedio de las determinaciones de cada individuo y para cada dosis. Las líneas horizontales son los valores de los antilog de las medias geométricas para cada dosis.

En el cuadro se observa para cada dosis, los valores en conteo por minuto de los antilog de las medias ± 2 DS. Se observa que en la dosis de $1,5 \mu\text{g}$ existe menos dispersión y que ésta aumenta a medida que se incrementan las dosis.

El segundo gráfico es la curva obtenida a partir de dosis crecientes de FHA del grupo de niños sanos estudiados. Se observa que la curva asciende hasta un máximo con la dosis de $50 \mu\text{g}$ y posteriormente desciende ligeramente con la dosis mayor.

DISCUSION

La transformación blastoide de los linfocitos provocada por la FHA es una prueba que actualmente tiene un valor extraordinario en los estudios de la inmunidad celular, ya que nos brinda una información acerca de la capacidad general de respuesta de los linfocitos timodependientes o linfocitos T.⁴

Existen una serie de parámetros que pueden sufrir variaciones según el método utilizado para realizar la técnica de la transformación blástica que hacen que los resultados entre los diferentes investigadores no sean iguales, así por ejemplo tenemos que la dosis de FHA,¹⁶ el tipo de FHA¹⁷ la cantidad de células incubadas,¹⁸ la actividad específica de la timidina tritiada,¹⁹ la edad del individuo¹¹

y hasta se ha señalado la influencia del ritmo circadiano,²⁰ deben considerarse cuando se van a valorar los resultados.

Muchos han sido los esfuerzos por estandarizar la técnica de transformación blástica para obtener un criterio que cuantifique la respuesta normal de los linfocitos a la FHA.^{18,21} En general se ha tomado como respuesta normal de los linfocitos, aquellos valores obtenidos con la dosis de FHA de estimulación máxima, después de tres días de cultivo.³

La estimulación con la dosis máxima de FHA resulta insuficiente para poder determinar la respuesta normal de los linfocitos, porque la estimulación podría ser lo suficientemente grande que no permitiera detectar estados inmunodeficientes que aparecen con pequeñas dosis de FHA.^{4,12,14}

Utilizando la curva dosis-respuesta a la FHA, además de obtenerse un patrón de respuesta en cada individuo, se utilizan dosis pequeñas de FHA, las cuales incrementan la potencia del método y hacen posible que se detecten diferentes grados de inmunodeficiencias en las funciones del linfocito T. Se ha informado, por ejemplo, que en la enfermedad de Hodgkin y en la ataxia-telangiectasia se obtienen respuestas normales a las dosis de FHA de máxima estimulación y que no es así cuando se utilizan pequeñas dosis de FHA.^{4,12}

En nuestro estudio encontramos que la curva dosis-respuesta se reproduce como lo han descrito otros autores. El

punto de máxima estimulación se obtuvo con la dosis de 50 μg de FHA, ya que con la dosis de 200 μg la respuesta fue ligeramente menor. No se emplearon dosis mayores, ya que nuestro interés radica en la detección de estados de inmunodeficiencias variables, los cuales se detectan sobre todo en la porción ascendente de la curva, es decir, con dosis menores. También la menor variabilidad de nuestros resultados la obtuvimos con las dosis menores, específicamente con la dosis de 1,5 μg obtuvimos una variabilidad aun menor que en la de nuestros controles, donde no estimulamos con FHA y se ha informado que a esta dosis es donde se obtiene la mayor producibilidad del método.¹²

En conclusión creemos que la curva dosis-respuesta a la FHA es una prueba que brinda una información más real del grado de respuesta de los linfocitos T que el empleo de una sola dosis de FHA, y por tanto, nos permite una mayor valoración de la capacidad general de la respuesta inmunológica celular.

Agradecimiento

Agradecemos la cooperación brindada por la Dirección Provincial de Pediatría de la Ciudad de La Habana, sin la cual no hubiese sido posible realizar este trabajo, así como la inestimable ayuda que recibimos de los policlinicos "Carlos J. Finlay" y "Elpidio Berovides" de Marianao, cuyo personal médico y técnico mostró el mayor interés.

También agradecemos la labor eficiente de las técnicas Isabel C. Pérez e Isabel Dinamarca, de nuestro laboratorio.

SUMMARY

García Santana, C. A. *Lymphocyte dose-response curve to phytohemagglutinin in healthy children.* Rev Cub Ped 52 5, 1980.

One of the most widely used assays to determine cellular immunity is blastic transformation of lymphocytes challenged by phytohemagglutinin (PHA). Some authors indicate the use of several increasing doses of mitogen to improve the interpretation of results at clinical diagnosis, since it would allow identifying immunodeficiency states that a maximum-challenge PHA dose could conceal. Since the dose-response curve to PHA seems to be a more complete assay of blastic transformation than a single challenge, we have studied a healthy children population for obtaining a reference pattern of cell-mediated immune response. 27 children, age 4 months through 5 years, were studied. Peripheral blood lymphocytes were purified by a method of centrifugation in density gradient. Lymphocytes were cultured and 1,5 μg ; 12,5 μg ; 50 μg ; 200 μg of PHA were challenged and a control was done with no challenge. They were incubated for 68 hours

and were given a 4-hour pulse with tritiated thymidine. Then, specimens were washed and dehydrated for reading in a fluid scintillation counter. Results are compatible to the curves reported by other authors.

RÉSUMÉ

García Santana, C. A. *Courbe dose-réponse des lymphocytes à la phytohémagglutinine chez des enfants sains.* Rev Cub Ped 52: 5, 1980.

Un des tests les plus utilisés pour déterminer l'immunité cellulaire c'est la transformation blastique des lymphocytes, lorsqu'ils sont stimulés par la phytohémagglutinine (PHA). Certains auteurs suggèrent l'emploi de plusieurs doses croissantes du mitogène pour améliorer l'interprétation des résultats dans le diagnostic clinique, car ceci permettrait de détecter des états d'immunodéficience qui pourraient être masqués par une dose unique de PHA de stimulation maximale. Puisque la courbe dose-réponse à la PHA semble être un test de transformation blastique plus complet que la stimulation unique, nous avons étudié un groupe d'enfants sains en vue d'obtenir un patron de référence de réponse immunologique à médiation cellulaire. L'étude a porté sur 27 enfants sains âgés entre 4 mois et 5 ans. Les lymphocytes du sang périphérique ont été purifiés par la méthode de centrifugation en gradient de densité. Ils ont été cultivés et stimulés avec 1,5 µg, 12,5 µg, 50 µg, 200 µg de PHA; en outre, nous avons fait un contrôle sans stimulation. Ils ont été incubés pendant 68 heures, et on leur a donnée une pulsion avec thymidine tritiée de 4 heures. Ensuite, les échantillons ont été lavés et déshydratés pour en faire la lecture au moyen d'un compteur à scintillation liquide. Les résultats obtenus s'accordent avec les courbes rapportées par d'autres auteurs.

РЕЗЮМЕ

Гарсия Сантана, К.А. *Кривая доза-ответ лимфоцитов на фитогемагглютин у здоровых детей.* Rev Cub Ped 52: 5, 1980.

Одной из наиболее используемых проб по определению клеточного иммунитета является бластическое преобразование лимфоцитов, когда они стимулируются фитогемагглютинином (ФГТ). Некоторые авторы предполагают применение различных возрастных доз митогена с целью улучшения толкования результатов при клинической постановке диагноза, поскольку это позволило бы выделить состояние недостаточности, что могло бы быть скрыто единственной дозой ФГТ максимального стимулирования. Так как кривая доза-ответ на ФГТ является пробой бластического преобразования наиболее сложного чем единого стимулирования, мы провели обследование группы здоровых детей с целью получения справочного образца среднего иммунного ответа клеток. Нами были исследованы 27 детей, возраст которых колебался от 4 месяцев до 5 лет. Были выделены лимфоциты периферической крови по методу центрифугации в градиенте плотности. Были культивированы лимфоциты и они были стимулированы дозами 1,5 мг, 12,5 мг, 50 мг, 200 мг ФГТ, а также был проведен контроль без стимулирования. Были инкубированы в течении 68 часов и был дан стимул с тринадцатиминутным в течении 4 часов. Позже пробы были промыты высушены с целью их прочтения на счетчике жидкого центеля. Полученные результаты являются сравнимыми с кривыми, информированными другими авторами.

BIBLIOGRAFIA

1. Ralf, M. C. T and B lymphocytes and immune response. Nature 242: 19, 1973.
2. Gotoff, S. P. Lymphocytes in congenital and immunological deficiency diseases. Clin Exp Immunol 3: 843, 1972.
3. Bloom, B. R. In vitro approaches to the mechanism of cell mediated immune reactions. Adv Immunol 13: 101, 1971.
4. Hosking, C. S. et al. Quantified deficiency of lymphocytes response to phytohemag-

- glutinin in Immune deficiency diseases. Clin Exp Immunol 9: 467, 1971.
5. *Lischner, H. W. et al.* Lymphocytes in congenital absence of thymus. Nature (Lond) 214: 580, 1967.
 6. *Roitt, I.M. et al.* The cellular basis of immunological response. Lancet II: 367, 1969.
 7. *Braeman, J.; P. Cottam.* The PHA response in Hodgkins disease. Eur J Cancer 11: 879, 1975.
 8. *McIntry, O.R.; A. F. Cole.* Variation in the response of normal lymphocytes to PHA. Int Arch Allergy Appl Immunol 35: 105, 1969.
 9. *Aldford, R. H. et al.* Ontogeny of human cell-mediated immunity: Age-related variation of in vitro infantile lymphocyte transformation. Infect Immunology 13: 1170, 1976.
 10. *Valentine, F. T.* The transformation and proliferation of lymphocytes in vitro. Cell-mediated immunity in vitro correlates. Karger, Basel, 1971. P. 6.
 11. *Fixa, B. et al.* Ageing and cell-mediated immunity. Gerontol 21: 177, 1975.
 12. *Faget, G. B.* Lymphocyte responsiveness to phytohemagglutinin (PHA): quantitative aspects and reproducibility. J Reticuloendothel Soc 16: 114, 1974.
 13. *Fitzgerald, M.* The establishment of a normal human population dose-response curve for lymphocytes cultured with PHA (phytohemagglutinin). Clin Exp Immunol 8: 421, 1971.
 14. *Fitzgerald, M.* A satisfactory quantitative test of lymphocyte response to phytohemagglutinin for the definition of normal control values and recognition of immunological defects. J Clin Pathol 25: 163, 1972.
 15. *Ziegler, J. B. et al.* The PHA dose-response curve: Validation of the use of logarithmic graph paper by computer analysis results. J Immunol 113: 2035, 1974.
 16. *Kimrey, M.A.C.* Dose-response curve of phytohemagglutinin in tissue culture of normal human leucocytes. Nature 204: 1002, 1971.
 17. *Richter, M.; C. K. Naspitz.* The variations in response of human peripheral lymphocytes to phytohemagglutinin in vitro. Int Arch Allergy Appl Immunol 32: 288, 1967.
 18. *Yamamura, M.* Standardization of lymphocyte transformation to PHA. Clin Exp Immunol 14: 457, 1973.
 19. *Sample, W. F.; P. B. Chratien.* Thymidine kinetics in human lymphocyte transformation: determination of optimal labelling conditions. Clin Exp Immunol 9: 419, 1971.
 20. *Carter, J. B. et al.* Standardization of tissue culture conditions for spontaneous thymidine-2- ¹⁴C incorporation by unstimulated normal human peripheral lymphocytes: Circadian rhythm of DNA synthesis. J Allergy Clin Immunol 56: 191, 1975.
 21. *Penhale, W. J. et al.* A rapid micro-method for the PHA— induced human lymphocyte transformation test. Clin Exp Immunol 18: 155, 1974.

Recibido: febrero 8, 1980.

Aprobado: abril, 30 1980.

Dr. Carlos García Santana

Centro Nacional de Investigaciones Científicas.
Apartado 6880. Ciudad de La Habana 16, Cuba.