

## DEFICIT DE CELULAS OKT4<sup>+</sup> EN NIÑOS CON ENFERMEDAD DE HODGKIN. INFORME PRELIMINAR

INSTITUTO NACIONAL DE ONCOLOGIA Y RADIOBIOLOGIA. LABORATORIO DE INMUNOLOGIA TUMORAL. DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

*Dra. María Elena Faxas\*, Dra. Marta Longchong\*\*, Dra. Mayra Valdés\*\*\*, Téc. María Elena García\*\*\*\* y Dr. Carlos Alberto García\*\*\*\*\**

Faxas, M.E. y otros: *Déficit de células OKT4<sup>+</sup> en niños con enfermedad de Hodgkin. Informe preliminar.*

Se estudiaron las poblaciones linfoides de sangre periférica en un grupo de niños y un grupo de adultos diagnosticados con enfermedad de Hodgkin (HDG). Se cuantificaron las subpoblaciones de linfocitos T (Rosetas-E<sup>+</sup>, OKT3<sup>+</sup>), linfocitos T "auxiliadores/inductores" (OKT4<sup>+</sup>), linfocitos T "citotóxicos/supresores" (OKT8<sup>+</sup>) y los linfocitos B (IgsS<sup>+</sup>). En el grupo de adultos enfermos, se encontraron niveles significativamente bajos de células Rosetas-E<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ). En el grupo de niños enfermos, se encontró una inversión evidente del índice OKT4<sup>+</sup>/OKT8<sup>+</sup> debido a que presentaron valores significativamente bajos de células OKT4<sup>+</sup> ( $p < 0,001$ ). Los resultados sugieren que en los niños con enfermedad de Hodgkin existe un incremento de la actividad supresora de la respuesta inmunológica, la cual podría estar asociada con el mecanismo de patogenia de la enfermedad.

### INTRODUCCION

Son múltiples las evidencias que afirman que los pacientes con enfermedad de Hodgkin (HDG) presentan deficiencias de su inmunidad celular.<sup>1-5</sup> Ultimamente, ha sido de particular interés el estudio de las alteraciones que presentan estos pacientes en los niveles de las diferentes células inmunorreguladoras que intervienen en la modulación de la respuesta inmunológica.

Antes de la "era" de los anticuerpos monoclonales (AcM) los linfocitos T se identificaban por su afinidad de unirse espontáneamente a los glóbulos rojos de carnero, formando las Rosetas-E. Las subpoblaciones de linfocitos T "auxiliadores" y "supresores" se identificaban mediante las Rosetas T $\mu$ , y T $\tau$ , respectivamente.<sup>6</sup> En la actualidad, el AcM OKT3 identifica a todos los linfocitos T,<sup>7</sup> el AcM OKT4 a los linfocitos T "citotóxicos/supresores",<sup>8,9</sup> de forma más específica al ser comparado con los métodos tradicionales.

\* Especialista de I Grado en Inmunología.

\*\* Especialista de II Grado en Oncología Pediátrica.

\*\*\* Especialista de I Grado en Oncología Pediátrica.

\*\*\*\* Técnica en Inmunología.

\*\*\*\*\* Especialista de I Grado en Inmunología. Jefe del Laboratorio de Inmunología Tumoral.

En los pacientes con enfermedad de HDG vírgenes de tratamiento, se ha informado que la proporción de linfocitos T, en sangre periférica, se encuentra disminuida significativamente cuando ha sido determinada por los métodos de Rosetas-E<sup>10,11</sup> o con sueros antilinfocitos T,<sup>12</sup> sin embargo, cuando dicha población de células es determinada a través del marcador OKT3, se ha registrado solamente una ligera disminución.<sup>13</sup> También se ha encontrado, en la enfermedad de HDG, una disminución de la población de células T $\mu^+$ , con un incremento de las Tr $^+$ ,<sup>14-16</sup> Sin presentar diferencias tan evidentes cuando son determinadas con los marcadores OKT4 y OKT8,<sup>13</sup>

En el presente trabajo, se informan los resultados preliminares de la determinación de las subpoblaciones linfoides de sangre periférica de un grupo de niños con enfermedad de HDG, los cuales, al ser comparados con los obtenidos en un grupo de adultos con la misma enfermedad, demuestran que solamente el grupo de niños presentó un desbalance de las proporciones de células OKT4 $^+$  y OKT8 $^+$  a expensas de una disminución significativa de la subpoblación de células OKT4 $^+$ .

## MATERIAL Y METODOS

### PACIENTES

Se estudiaron, previo tratamiento, 5 niños y 16 adultos diagnosticados en nuestro instituto, clínica e histológicamente, con enfermedad de HDG. La clasificación histológica y el estadiamiento clínico se realizaron acorde con la nomenclatura de Rye y las recomendaciones de Ann Arbor.

### CONTROLES

El grupo control estuvo integrado por 9 niños y 16 adultos con edades similares a los pacientes, sin enfermedad aparente ni referida y con eritrosedimentación normal.

### OBTENCION DE LOS LINFOCITOS

Los linfocitos fueron purificados a partir de sangre venosa, heparinizada por centrifugación en gradiente de densidad.<sup>17</sup>

El anillo obtenido se lavó 3 veces por centrifugación a 200 G, 10 minutos con tampón fosfato-salino 0,15 M, pH 7,2 (TFS). Las células fueron ajustadas a 2 x 10<sup>6</sup> células viables/ml, en medio Hank.

### ROSETAS-E

Los 0,2 ml de la suspensión de linfocitos y 0,2 ml de una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 0,25 %, en medio Hank, fueron incubados a 37 °C durante 5 minutos. Se centrifugó a 50 G durante 5 minutos y se incubó a 4 °C durante 1 hora.

El sedimento fue resuspendido cuidadosamente y se montó entre cubre y portaobjeto para su observación. Se contaron 200 células y se consideraron rosetas a los linfocitos con 3 o más glóbulos rojos adheridos a su superficie.

## INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA<sup>18</sup>

Se incubaron  $2 \times 10^6$  linfocitos a  $37^\circ\text{C}$ , 30 minutos, con una solución de albúmina bovina al 0,1 % y  $\text{NaN}_3$  al 0,02 % en TFS. Se lavaron 3 veces por centrifugación con igual tampón al  $37^\circ\text{C}$ . Al sedimento se le añadió  $20 \mu\text{l}$  de una dilución 1:30 de suero de carnero antiinmunoglobulinas humanas conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Wellcome Lab. USA) y se incubó a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Se lavó 3 veces por centrifugación con el mismo tampón y el sedimento fue resuspendido en  $10 \mu\text{l}$  de TFS-glicerol (1:9). Las células se observaron entre cubre y portaobjeto en un microscopio de luz fluorescente Leitz (RFA). Se contaron 200 células y se consideraron positivas aquellas con 3 o más puntos fluorescentes en su superficie.

## INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Se siguieron los mismos pasos previos de la inmunofluorescencia directa. Las células, previamente incubadas con la solución de TFS-albúmina bovina 0,1 %,  $\text{NaN}_3$  0,02 % y posteriormente lavadas, fueron incubadas a  $4^\circ\text{C}$  con los AcM OKT3, OKT4, OKT8 en tubos diferentes durante 30 minutos. Se lavaron 3 veces por centrifugación con TFS-albúmina bovina 0,1 %,  $\text{NaN}_3$  0,02 %. El sedimento se resuspendió en  $20 \mu\text{l}$  de una dilución 1:30 de suero de conejo antiinmoglobulina de ratón (Meloy Lab. USA) y se incubó a  $4^\circ\text{C}$ , 30 minutos. Se lavaron igual que anteriormente. El sedimento se resuspendió en  $10 \mu\text{l}$  de TFS-glicerol.

Se montó entre cubre y portaobjeto y se contaron 200 células. Se consideraron positivas las células con 3 o más puntos fluorescentes en su superficie.

Se calculó el índice  $\text{OKT4}^+/\text{OKT8}^+$  por la siguiente relación:

$$\text{Índice } \text{OKT4}^+/\text{OKT8}^+ = \frac{\% \text{ células } \text{OKT4}^+}{\% \text{ células } \text{OKT8}^+}$$

## METODOS ESTADISTICOS

Se utilizaron los métodos convencionales para el cálculo de la media aritmética y la desviación estándar. La comparación de las variables se realizó con el estadígrafo de la *t* de Student.

## RESULTADOS

En la tabla 1, se resumen los resultados obtenidos del estudio de las subpoblaciones linfoides de los grupos de pacientes con enfermedad de HDG y la comparación realizada con sus respectivos controles.

Los pacientes adultos solamente presentaron una disminución significativa de las células formadoras de Rosetas-E ( $p < 0,05$ ). El resto de las subpoblaciones se encontraron dentro de los límites normales, al igual que el índice  $\text{OKT4}^+/\text{OKT8}^+$ .

En el grupo de niños con enfermedad de HDG se encontraron valores significativamente más bajos que los controles de células  $\text{OKT4}^+$  ( $P < 0,001$ ). El resto de las subpoblaciones se encontraba dentro de los límites normales, aunque son de destacar la tendencia de valores bajos de las Rosetas-E<sup>+</sup>, y  $\text{OKT3}^+$  y la tendencia a valores altos de las células  $\text{OKT8}^+$ , con la evidente inversión del índice  $\text{OKT4}^+/\text{OKT8}^+$ .

Tabla 1. Porcentaje de subpoblaciones linfoides en pacientes con enfermedades de Hodgkin

| Grupos estudiados            | Rosetas-E       | OKT3 <sup>+</sup> | OKT4 <sup>+</sup> | OKT8 <sup>+</sup> | Índice<br>OKT4 <sup>+</sup> /OKT8 <sup>+</sup> | IgsS <sup>+</sup>  |
|------------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|--|--------------------|
| Niños enfermos<br>(n = 5)    | 55,8<br>(40-72) | 56,4<br>(44-69)   | 26,0<br>(22-30)   | 31,4<br>(19-44)   | 0,82   | 11<br>(2,4-19,6)   |
| Niños sanos<br>(n = 9)       | 65,5<br>(59-72) | 63,7<br>(56-71)   | 42,6<br>(38-48)   | 25,4<br>(19-32)   | 1,67   | 16,2<br>(9,2-23,2) |
| P <                          | NS              | NS                | 0,001             | NS                | -  | NS                 |
| Adultos enfermos<br>(n = 16) | 51,1<br>(37-65) | 62,5<br>(51-74)   | 46,1<br>(30-62)   | 23,3<br>(15-32)   | 1,98   | 18<br>(7,8-28,2)   |
| Adultos sanos<br>(n = 16)    | 62,4<br>(54-71) | 69,6<br>(53-76)   | 46,5<br>(38-55)   | 26,1<br>(19-33)   | 1,78   | 16<br>(19,9-21,1)  |
| P <                          | 0,05            | NS                | NS                | NS                | -  | NS                 |

Legenda: NS : No significativo.

En la tabla 2 se muestran las determinaciones y las características individuales de cada niño enfermo y se observa que la niña K.T.V. tiene un comportamiento muy diferente al resto de los niños, pues además de tener la depresión de las células OKT4<sup>+</sup>, también presenta depresión de las células OKT3<sup>+</sup>, OKT8<sup>+</sup> y Rosetas-E<sup>+</sup>, no se presentó inversión del índice OKT4<sup>+</sup>/OKT8<sup>+</sup>. Esta niña fue la única que presentó evolutivamente neumonía, piodermatitis y hepatitis, como complicaciones de su enfermedad.

Tabla 2. Características individuales de los niños con enfermedad de Hodgkin

| Pacientes | Sexo | Edad | Estadio<br>clínico | Clasifica-<br>ción histo-<br>lógica | Rose-<br>tas-E | OKT3 <sup>+</sup> | OKT4 <sup>+</sup> | OKT8 <sup>+</sup> | Índice<br>OKT4 <sup>+</sup> /OKT8 <sup>+</sup> | IgsS <sup>+</sup> |
|-----------|------|------|--------------------|-------------------------------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|--|-------------------|
| A.R.P.    | ♂    | 10   | IV B               | CM                                  | 58             | 54                | 23                | 34                | 0,67   | 0                 |
| E.P.C.    | ♂    | 6    | II A               | PL                                  | 71             | 68                | 23                | 48                | 0,47   | 6                 |
| A.N.H.    | ♂    | 8    | I A                | CM                                  | 74             | 70                | 32                | 35                | 0,94   | 11                |
| L.S.F.    | ♂    | 12   | I A                | EN                                  | 43             | 55                | 22                | 30                | 0,73   | 26                |
| K.T.V.    | ♀    | 12   | II B               | nc                                  | 33             | 35                | 30                | 10                | 3,0  | 12                |

Nota: Los resultados se expresan en %.

Legenda: CM: Celularidad mixta. PL: Predominio linfocítico. EN: Esclerosis nodular. nc: No clasificable.

## DISCUSION

El mecanismo por el cual existe un defecto de los linfocitos en la enfermedad de HDG, es un problema que aún no ha sido aclarado.

En nuestros resultados preliminares, encontramos que existen algunas diferencias entre la enfermedad de HDG en el niño y en el adulto, en cuanto a su comportamiento en los niveles de las subpoblaciones linfoides de sangre periférica.

La población de células T en el grupo de pacientes adultos se encontró significativamente disminuida al ser evaluada con el método de Rosetas-E y ligeramente disminuida cuando se evaluó a través del marcador OKT3, tal y como ha sido señalado en otros estudios.<sup>10, 11, 13</sup> En los niños enfermos, por su parte, con la utilización de ambos marcadores, solamente se observó la tendencia hacia valores bajos de linfocitos T, la cual posiblemente se haga más evidente cuando se incremente el número de pacientes niños en el estudio.

Los niños enfermos presentaron un evidente desbalance entre las cantidades de linfocitos "auxiliares/inductores" y "citotóxicos/supresores" que se debió, fundamentalmente, a los valores significativamente bajos de las células OKT4<sup>+</sup>. De hecho, en los niños con enfermedad de HDG existe un incremento relativo de la actividad supresora del sistema inmunológico, la cual podría estar implicada por una parte, en el mecanismo de patogenia de la enfermedad, y por otra, en la expresión de la inmunodeficiencia celular que se presenta en dicha enfermedad.<sup>3, 4, 19</sup>

Los pacientes con enfermedad de HDG que presentan valores altos de células OKT8<sup>+</sup> han tenido mejor evolución clínica que los pacientes con niveles bajos de estas células<sup>13</sup> por lo que consideramos que el buen pronóstico que tienen los niños enfermos con respecto a los adultos,<sup>20</sup> puede estar relacionado con el incremento relativo de las células OKT8<sup>+</sup> que encontramos en ellos.

La paciente K.T.V., que presentó valores disminuidos en la proporción de todas las subpoblaciones de linfocitos T, en general, y de células OKT8<sup>+</sup>, en particular, a pesar de encontrarse en el estadio II de la enfermedad, fue la única que tuvo serias complicaciones infecciosas, y que, además, presentó precozmente la recaída de su enfermedad antes de concluir el ciclo de tratamiento de inducción, lo cual es un elemento más que apoya el criterio de que el sistema inmunológico desempeña un papel importante en la evolución, favorable o desfavorable, de la enfermedad de HDG.<sup>21-23</sup>

Es conocido que la terapéutica moderna tiende a efectuar tratamientos más conservadores para el control de las enfermedades malignas, con el propósito de reducir las complicaciones tardías que producen los tratamientos antineoplásicos. Este trabajo es el inicio de un estudio encaminado hacia la búsqueda de marcadores inmunológicos que puedan ser de utilidad para el desarrollo de nuevos diseños terapéuticos que contribuyan a la mejor atención médica de nuestros pacientes.

## Agradecimientos

*Agradecemos la colaboración brindada por el personal del Servicio de Pediatría de nuestro instituto y a la Técnica Miriam Zaldívar por su participación eficiente en el desarrollo de los métodos inmunológicos, así como a la Agencia SAREC de Suecia, por haber financiado este trabajo.*

## SUMMARY

Faxas, M.E. et al.: *Deficit of OKT4<sup>+</sup> cells in children with Hodgkin's disease. Preliminary report.*

Blood lymphocyte subpopulations have been studied in untreated children and adults with Hodgkin's disease. T-lymphocytes were determined by the E-rosette technique and by OKT3 monoclonal antibodies. OKT4 and OKT8 monoclonal antibodies were used to identify T-cell subsets with "helper/inducer" and suppressor/cytotoxic activity, respectively. The percentage of E<sup>+</sup> cells was significantly reduced in adult patients ( $p < 0,05$ ). The OKT4<sup>+</sup>/OKT8<sup>+</sup> blood lymphocyte ratio was abnormally low in children because total number of OKT4<sup>+</sup> cells was significantly reduced in this group ( $p < 0,001$ ). Results suggest an increase of suppressor activity in children with Hodgkin's disease, which could be one of the factors in the pathogenesis of Hodgkin's disease.

## RÉSUMÉ

Faxas, M.E. et al.: *Déficit de cellules OKT4<sup>+</sup> chez des enfants atteints de la maladie de Hodgkin. Rapport préliminaire.*

Les populations lymphoïdes de sang périphérique sont étudiées chez un groupe d'enfants et chez un groupe d'adultes atteints de la maladie de Hodgkin (HDG). Il a été quantifié les souspopulations de lymphocytes T (Rosettes-E<sup>+</sup>, OKT3<sup>+</sup>), lymphocytes T "auxiliaires/inducteurs" (OKT4<sup>+</sup>), lymphocytes T "cytotoxiques/suppresseurs" (OKT8<sup>+</sup>) et les lymphocytes B (IgsS<sup>+</sup>). Dans le groupe d'adultes malades, il a été rencontré de taux significativement diminués de cellules Rosettes-E<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ). Dans le groupe d'enfants malades, il a été constaté une inversion évidente de l'indice OKT4<sup>+</sup>/OKT8<sup>+</sup>, puisqu'ils ont présenté des valeurs significativement faibles de cellules OKT4<sup>+</sup> ( $p < 0,001$ ). Les résultats suggèrent que chez les enfants atteints de la maladie de Hodgkin il existe un accroissement de l'activité de suppression de la réponse immunologique, qui pourrait être associée avec le mécanisme de pathogenèse de la maladie.

## BIBLIOGRAFIA

1. Reed, D.M.: On the pathological changes in Hodgkin's disease with special reference to its relation to tuberculosis. Johns Hopkins Hosp Rep 10: 133-196, 1902.
2. Kelly, W.D.: The altered response to skin homografts and to delayed allergens in Hodgkin's disease. Surg Forum 9: 785-789, 1958.
3. Holm, G. et al.: Impaired phytohemagglutinin-induced cytotoxicity in vitro of lymphocytes from patients with Hodgkin's disease on chronic lymphatic leukemia. Clin Exp Immunol 2: 351-360, 1967.
4. Holm, G. et al.: Lymphocyte abnormalities in untreated patients with Hodgkin's disease. Cancer 37: 751-762, 1976.
5. Expósito, G. y otros: Estudio de la sensibilización al dinitroclorobenceno en un grupo de pacientes con enfermedad de Hodgkin. Rev Cub Oncol 1(3): 1984 (en prensa).
6. Morretta, L. et al.: Subpopulations of human T cells identified by receptors from immunoglobulins and mitogen responsiveness. J Immunol 117: 2171, 1976.
7. Kung, P.C. et al.: Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. Science 206: 347-349, 1979.
8. Evans, R.L. et al.: Two functionally distinct subpopulations of human T cells that collaborate in the generation of cytotoxic cells responsible for cell mediated lympholysis. J Immunol 120: 1423-1428, 1978.
9. Reinherz, E.L. et al.: Further characterization of human inducer T cell subset defined by monoclonal antibody. J Immunol 123: 2894-2896, 1979.
10. Aiuti, F. et al.: Lymphocyte surface markers in lymphoproliferative disorders. Acta Haematol 50: 275-283, 1973.
11. Andersen, E.: Depletion of thymus dependent lymphocytes in Hodgkin's disease. Scand J Haematol 12: 263-269, 1974.

12. *Bobrove, A.M. et al.*: Quantitation of T and B lymphocytes and cellular immune function in Hodgkin's disease. *Cancer* 36: 169-179, 1975.
13. *Lauria, F. et al.*: Increased proportion of suppresor/cytotoxic (OKT8<sup>+</sup>) cells in patients with HD in long-lasting remission. *Cancer* 52: 1385-1388, 1983.
14. *Romagnanin, S. et al.*: Altered proportion of T<sub>H</sub> and T cell subpopulations in patients with HD. *Scand J Immunol* 7: 511-514, 1978.
15. *Posner, M.R. et al.*: Lymphoid subpopulations of peripheral blood and spleen in untreated Hodgkin's disease. *Cancer* 48: 1170-1176, 1981.
16. *Karande, A. A. et al.*: Subpopulations of human T lymphocyte in patients with Hodgkin's disease before and after treatment. *Neoplasma* 29: 149-159, 1982.
17. *García, C.A.; C. Silva*: Cultivo y estimulación de linfocitos humanos purificados con verografín. Reporte preliminar. *Revista de CNIC* 10: 199-203, 1979.
18. *Petterson, D. et al.*: IgG on human blood lymphocytes studies by immunofluorescence. *Scand J Immunol* 8: 531-542, 1978.
19. *Björkholm, M. et al.*: Persisting lymphocyte deficiencies during remission in Hodgkin's disease. *Clin Exp Immunol* 28: 389, 1977.
20. *Tan, C.T. et al.*: Distinguishing features of the Immunology of Hodgkin's disease in children. *Cancer Treat Rep* 66: 964-975, 1982.
21. *Björkholm, M. et al.*: Prognostic factors in Hodgkin's disease. II. The role of the lymphocyte defect. *Scand J Haematol* 20: 306-318, 1978.
22. *Björkholm, M.*: Immunodeficiency in Hodgkin's disease and its relation to prognosis. *Scand J Haematol (Suppl)* 33, 1978.
23. *Holm, G. et al.*: Lymphocyte abnormalities and serum factors in Hodgkin's disease. In: R.H. Neuberger (Ed.): Naturally occurring biological immunosuppressive factors and their relationship to disease. Cleveland, USA. CRC Press, 1979. Pp. 3-36.

Recibido: 13 de enero de 1985. Aprobado: 12 de mayo de 1985.

Dra. *María Elena Faxas*. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. 29 y E, Vedado, Ciudad de La Habana 4, Cuba.

# NO FUME

## GUIDE SU SALUD

# NO FUME...

