

INSTITUTO NACIONAL DE ENDOCRINOLOGIA Y METABOLISMO

Linfocitos T activos en el bocio tóxico difuso: Niveles de los mismos en relación con el estado funcional de la glándula tiroides

Por los Dres.:

ANGEL URIARTE RUBIO, FRANCISCO OCHOA TORRES"

y RADAMES VENTURA RAMIREZ

Uriarte Rubio, A. y otros. Linfocitos T activos en el bocio tóxico difuso: Niveles de los mismos en relación con el estado funcional de la glándula tiroides. Rev Cub Med 22: 4, 1983.

Se informa que en un trabajo preliminar se encontró que los niveles de linfocitos T activos (LTA) estaban disminuidos en pacientes con BTA. Se señala que el objetivo de este trabajo consistió en conocer si los niveles de los mismos se modificaban una vez que el paciente estuviese eutiroideo, así como correlacionarlos con los niveles de hormona tiroidea. Se estudiaron para ello ocho pacientes hipertiroideos, a los cuales se les determinó linfocitos T activos. T_4 por RIA y captación de Ta por resina. Se utilizó como tratamiento propiltiuracilo en dosis de 300-400 mg diarios. Se obtuvo como resultado que en la totalidad de los pacientes, los niveles de LTA estaban disminuidos antes del tratamiento; a los seis meses, todos los casos estaban eutiroideos y en seis de ellos, los niveles de LTA eran normales. Se halló una correlación significativa entre los niveles de LTA, los niveles de T_4 y el índice de tiroxina libre. Se informa que el estudio de los LTA en pacientes hipertiroideos bajo tratamiento con drogas antitiroideas, podría servir para determinar si existe remisión inmunológica, y ayudaría a determinar el momento de la supresión del medicamento, así como a evaluar su efectividad.

INTRODUCCION

En la actualidad, parece estar demostrado que el bocio tóxico difuso (BTD) o enfermedad de Graves, es una enfermedad autoinmune.^{1,2} Además de las evidencias humorales establecidas, como son la presencia de auto- anticuerpos contra receptores de membrana para la tirotropina, contra la tiroglobulina y contra antígenos microsomales, existen indicios de compromiso de los mecanismos inmunes celulares en esta enfermedad.^{3,5} Con la utilización de la técnica de la roseta E activa,⁶ hemos demostrado previamente que en los enfermos con BTD antes del tratamiento, los valores de

linfocitos T activos (linfocitos T con alta afinidad para los glóbulos rojos de carnero están disminuidos.⁷ Según Wybran y colaboradores,^{8,9} el nivel de estas células en la sangre periférica de humanos, indica el *status* inmune celular de los mismos.

El propósito de este trabajo fue conocer si los niveles de linfocitos T activos (LTA) se normalizaban una vez que cesara el estado hipertiroides, así como tratar de establecer una correlación de los mismos con los niveles de tiroxina sérica.

MATERIALES Y METODOS

Pacientes

Se estudiaron ocho pacientes con BTD (edad promedio 36 años; rango 28-42 años; todas del sexo femenino), sin tratamiento previo y sin historia reciente de haber padecido enfermedades infecciosas. Como tratamiento se utilizó propiltiouracilo (PTU) en dosis de 300-400 mg diarios. En todos los casos se determinaron linfocitos T activos, T y captación de T_i por resina; antes, a los tres y a los seis meses de la administración del medicamento.

Cuantificación de LTA

Se obtuvo sangre por punción venosa de los pacientes y se utilizó heparina como anticoagulante. Los linfocitos periféricos se obtuvieron al diluir las muestras 1:1 con solución fisiológica normal y se colocaron cuidadosamente 10 ml de esta suspensión sobre 5 ml de visotrast (mezcla de la sal disódica y la sal metil glucamínica del ácido N, N' diacetil 3-5 diamino 2-4-6 triyodo benzoico), diluido hasta una densidad de 1.077¹⁰ y se centrifugaron a 400 x g a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los linfocitos se tomaron de la interfase, se lavaron tres veces con solución salina normal y se suspendieron en medio TC-199 (Wellcome Reagents L. td). La viabilidad de las células, según el método de exclusión de tripanazul, fue en todos los casos superior al 95%. Se preparó una suspensión de glóbulos rojos de carnero, a partir de células conservadas en solución Alsever, a 4°C y no más de 10 días de extraídas. La suspensión contenía 1 x 10⁹ eritrocitos/ml¹¹ y a partir de ésta se hicieron las diluciones convenientes, de acuerdo con el número de linfocitos obtenidos según el caso, de tal forma que la relación eritrocito-linfocito fuese 8:1.

Para cada determinación se centrifugaron a 200 x g, 0,25 ml de la suspensión de linfocitos, con 0,25 ml de la suspensión de eritrocitos, durante cinco minutos. Terminada la centrifugación, se añadió igual volumen de glutaraldehído al 1,2% y se dejó a 4°C durante 15 minutos.

Una gota por duplicado del precipitado diluido en agua, se colocó sobre láminas portaobjetos, dejándose secar durante la noche, luego se colorearon con hematoxilinaeosina y se contaron bajo el microscopio 400 células en cada preparación por dos observadores distintos.

Como roseta se consideraron la adherencia de tres o más glóbulos rojos de carnero a un linfocito.

Determinaciones hormonales

El suero obtenido el mismo día de la toma de muestra para la determinación de los LTA, se conservó a -20°C hasta su uso.

Se determinó la concentración sérica de tiroxina por RIA, según el método descrito por Mitsuma y colaboradores¹² y la captación de T en suero.¹³

El índice de T libre se calculó como el cociente entre la concentración de T, y la captación de T.

Para el análisis estadístico se utilizó el rango de correlación de Spearman y la prueba t de series apareadas.

RESULTADOS

Valores de linfocitos T activos

Los niveles basales individuales de linfocitos T activos antes del tratamiento en todos los casos, fueron inferiores al 20% (valores normales $28,4 \pm 7,6\%$, media ± 2 DS), con un valor promedio de $14,1 \pm 5,6\%$ (media \pm DS).

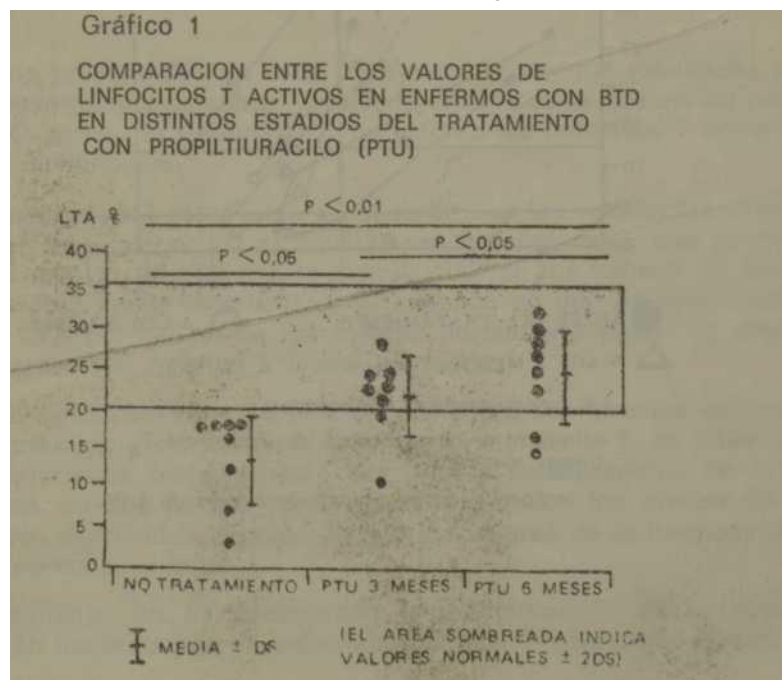
A los tres meses de tratamiento, en seis de los ocho casos hay una recuperación de los LTA y los valores alcanzan cifras normales (más del 20%) con un promedio de $21,6 \pm 5,0\%$ (media \pm DS).

A los seis meses de tratamiento se observa un mayor aumento de los LTA en los casos en que se había observado una recuperación a los tres meses, con un valor promedio de $24,5 \pm 6,1\%$ (media \pm DS).

En dos de los ocho casos, los valores se mantuvieron por debajo de las cifras normales antes y en el transcurso del tratamiento.

Las diferencias entre los valores de LTA antes del tratamiento y a los tres meses y entre los tres meses y seis meses, son significativas con una $p < 0,05$.

Las diferencias entre los valores antes del tratamiento y a los seis meses son significativas con una $p < 0,01$ (prueba t de series apareadas) (gráfico 1).

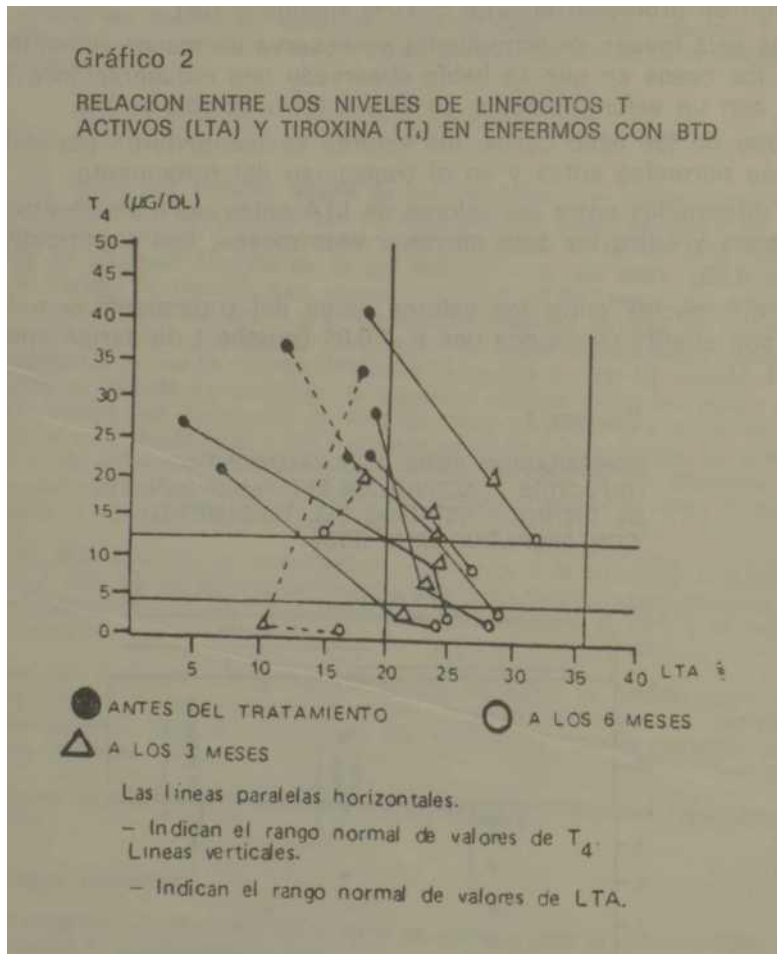


R.C.M.
JULIO-AGOSTO, 1983

Relación entre los valores de LTA y de tiroxina sérica

En la totalidad de los casos, los valores de T₄ sérica antes del tratamiento fueron superiores a los normales (4,2-11,2 μ g/dl), con un rango entre 22,4 y 42,0 ng/dl. En todos se observó una disminución de la misma que correspondió en seis de los casos, con un aumento de los niveles de LTA, hasta valores normales. Hallamos una correlación negativa significativa para $\alpha = 0,05$ (rango de correlación de Spearman) (gráfico 2).

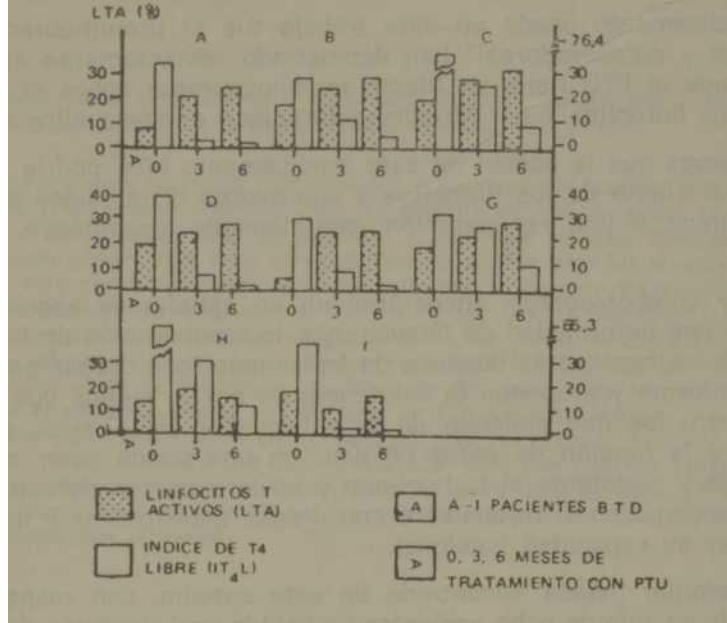
En el gráfico 3 se puede observar la relación entre los valores de LTA y el índice de tiroxina libre. Sólo en los casos H e I, los niveles de LTA se mantienen por debajo de los valores normales.



R.C.M.
JULIO-AGOSTO, 1983

Gráfico 3

ESTUDIO EVOLUTIVO DE LOS LINFOCITOS T
ACTIVOS Y EL INDICE DE T₄ LIBRE EN PACIENTES
CON BT D DURANTE TRATAMIENTO



DISCUSION

Los datos presentados en este trabajo confirman los resultados obtenidos por nosotros previamente,⁷ en donde encontramos que en los pacientes con BT D antes del tratamiento, los valores de linfocitos T activos se encuentran disminuidos.

Los enfermos aquí estudiados de acuerdo con los resultados podemos dividirlos en dos categorías: a) aquéllos en que coinciden una normalización de los niveles de LTA con la disminución de los valores de tiroxina sérica (gráfico 2 líneas continuas) y b) aquellos en que se mantienen los niveles de LTA por debajo de los valores normales a pesar de cesar el estado hipertiroides (gráfico 2 líneas punteadas).

Los valores disminuidos de LTA en pacientes con tiroxina aumentada pudieron atribuirse a cierto efecto inmunosupresor de la T₄ en altas dosis, situación informada recientemente por *Wall y colaboradores* en ratas.¹⁴ Sin embargo, en dos de los casos aquí presentados los niveles de LTA se mantienen deprimidos, a pesar de que los* valores de la hormona alcanzan cifras normales y bajas.

Recientemente, se ha demostrado una disminución de la actividad supresora en los linfocitos de enfermos con BT D.^{13*16} Nosotros hemos postulado, que los LTA tienen

actividad supresora⁷ y al disminuir sus niveles por diferentes causas entre las que podría estar el estrés, en personas genéticamente predispuestas, llevaría a una interacción entre linfocitos T cooperantes autorreactivos previamente formados y linfocitos B con la consecuente formación de inmunoglobulinas tiroide-estimulantes (TSI), las cuales son las causantes del hipertiroidismo en estos pacientes.

El medicamento usado en este trabajo fue el propiltiouracilo (PTU). *Hallengren y colaboradores*¹⁷ han demostrado recientemente en trabajos *in vitro*, que el PTU tiene un efecto inmunosupresor sobre la activación inducida de linfocitos T por fitohemoaglutinina y concanavalina A.

Estimamos que la acción de este medicamento bien podría deberse a sustituir el efecto de los linfocitos T supresores disminuidos en el BTD, y dar tiempo a una recuperación, posiblemente espontánea, de estos últimos.

*Aoki y colaboradores*¹⁵ encuentran en un estudio de seguimiento de pacientes con enfermedad de Graves, que la recuperación de la actividad de las células supresoras después de tratamiento con drogas antitiroideas no fue uniforme y proponen la existencia de por lo menos dos subpoblaciones entre los que padecen de la enfermedad de Graves, en lo que respecta a la función de estas células: en una puede estar extremadamente baja y resistente al tratamiento y en la otra, con defectos ligeros, que responden bien al tratamiento con drogas antitiroideas y que pueden restablecer su capacidad funcional.

Algo similar hemos encontrado en este estudio, con respecto a los LTA, donde en seis de ocho pacientes ha habido una elevación de sus niveles hasta valores normales y en dos casos se mantienen deprimidos a los seis meses de tratamiento.

Algunos investigadores¹⁸⁻¹⁹ han tratado de utilizar la actividad antirreceptora de la tirotropina (TSI, TBII, TDA, etc.) del suero de pacientes sometidos a tratamiento con drogas antitiroideas, para determinar si existe remisión inmunológica en estos pacientes. Los resultados hasta ahora son muy contradictorios y los métodos usados son trabajosos, caros y requieren de equipos y personal muy especializados.

La determinación de los niveles de LTA podría servir con fines similares, lo que sería de un indudable valor diagnóstico, pues ayudaría a determinar el momento de la supresión del medicamento, así como a evaluar su efectividad.

SUMMARY

Uriarte Rubio, A. et al. *Active T-lymphocytes in diffuse toxic goitre: their level in relation to functional condition of thyroid gland.* Rev Cub Med 22: 4, 1983.

It is reported that in a preliminary work it was found that active T-lymphocyte (ATL) levels were decreased in patients with DTG. It is outlined that the object of this paper consisted in knowing if their levels were modified once the patient should be euthyroid, as well as how come to correlate them to thyroid hormone levels. For this purpose eight hyperthyroid patients to whom active T-lymphocytes were determined, T, by radioimmuno

assay and T₃ by resin capture, were studied. As treatment, propylthiouracil at 300-400 mg daily dose was used. As result, in all the patients ATL levels were decreased before treatment, within six months all the cases were euthyroids, and in six of the patients ATL levels were normal. A significant correlation between ATL and T₃ levels and free thyroxine index was found. It is reported that the study of ATL in hyperthyroid drugs should be good to determine if there is immunologic remission and should help to determine the time for drug withdrawal, as well as for assessment of its effectiveness.

RÉSUMÉ

Uriarte Rubio, A. et al. *Lymphocytes T actifs dans le goitre toxique diffus: leur taux par rapport à l'état fonctionnel de la thyroïde*. Rev Cub Med 22: 4, 1983.

Il est rapporté que dans un travail préliminaire il a été rencontré que les taux de lymphocytes T actifs (LTA) étaient diminués chez les patients atteints de goitre toxique diffus (GTD). Le but de ce travail était de connaître si ces taux variaient lorsque le patient était de nouveau euthyroïdien, ainsi qu'établir une corrélation avec les niveaux d'hormone thyroïdienne. Pour ceci les auteurs ont étudié huit patients hyperthyroïdiens chez lesquels ils ont fait le dosage des lymphocytes T actifs, T₃ par RIA et captation T_s par résine. Les malades ont été traités par du propylthio-uracile, en doses de 300-400 mg par jour. Les résultats obtenus ont été les suivants: chez tous les patients les taux de LTA étaient diminués avant le traitement; au bout de six mois, tous les patients étaient euthyroïdiens et chez six d'entre eux les taux de LTA étaient normaux. Il a été trouvé une corrélation significative entre les niveaux de LTA, les niveaux de T₃ et l'indice de thyroxine libre. Il est rapporté que l'étude des LTA chez des patients hyperthyroïdiens traités par des drogues antithyroïdiennes pourrait servir à déterminer s'il existe une rémission immunologique, et aiderait à déterminer le moment de l'arrêt du médicament, ainsi qu'à évaluer son efficacité.

BIBLIOGRAFIA

1. Allison, A. C.: Self tolerance and autoimmunity in the thyroid. N Engl J Med 295: 821, 1977.
2. Volpe, R.: The pathogenesis of Graves' disease: an overview. Clin Endocrinol Metab 7: 3, 1978.
3. Lamki, L., V. V. Row; R. Volpe: Cell mediated immunity in Graves' disease and in Hashimoto's thyroiditis as shown by the demonstration of migration inhibition factor (MIF). J Clin Endocrinol Metab 15: 316, 1973.
4. Kidd, A.; N. Okita; V. V. Row; R. Volpe: Immunological aspects of Graves' and Hashimoto's diseases. Metabolism 29: 80, 1980.
5. Okita, N.; D. Topf; M. Lewis; V. V. Row; R. Volpe: T-Lymphocyte sensitization in Graves' and Hashimoto's diseases confirmed by an indirect migration inhibition factor test. J Clin Endocrinol Metab 52: 523, 1981.
6. Wybran, J.; M. C. Carr; H. M. Fudenberg: The human rosette-forming cell as a marker of a population of thymus-derived cells. J Clin Invest 51: 2537, 1972.
7. Uriarte, A.; E. Alavez: Valores de linfocitos T activos en pacientes con bocio toxico difuso (Graves-Basedow). Rev Soc Colomb Endocrinol 12: 28, 1979.
8. Wybran, J.; A. S. Levin; L. E. Spittler; H. H. Fudenberg: Rosette-forming cells, immunologic deficiency disease and transfer factor. N Engl J Med 288: 710, 1973.
9. Wybran, J.; H. H. Fudenberg: Thymus derived rosette-forming cells in various human disease states: cancer, lymphoma, bacterial and viral infections, and other diseases. J Clin Invest 52: 1026, 1973.

10. *Mallea, L.; J. W. Diaz; F. de la Cruz; A. A. González*: Simple procedure for the separation of human peripheral blood lymphocytes. In: NIAID Manual of Tissue Typing Techniques 1979-1980. Editado por John G. Ray, NIH Publication No. 80-545, 1979. p. 79.
11. *Kabat, E. A.; M. M. Mayers*: Experimental Immunochemistry. Thomas Publisher. Springfield, Illinois, USA, 1964. P. 213.
12. *Mituma, T.; J. Colucci; C. S. Shenkman; Hollander*: Rapid simultaneous radioimmunoassay for triiodothyronine and thyroxine in unextracted serum. *Biochem Biophys Res Commun* 46: 2107, 1972.
13. *Baldor, F.; S. Blanca; C. del Valle*: Método para determinar la captación de triiodoti-ronina 125 I por suero. *Revista CNIC* 12: 43, 1981.
14. *Wall, J. Ft.; D. M. Joyner; E. A. Ryan*: Effects of experimental hyper- and hypothyroidism on B and T lymphocyte reactivity to bacterial, fungal and tissue antigens. Symposium on Autoimmune Aspects of Endocrine Disorders, Pisa, Italy, April 19-21, Program and Abstracts, Academic Press, 1979. P. 68.
15. *Aoki, N.; K. M. Pinnamaneni; L. S. De Groot*: Studies on suppressor cell function in thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 48: 803, 1979.
16. *Okita, N.; V. V. Row; R. Volpé*: Suppressor T-lymphocyte deficiency in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 52: 528, 1981.
17. *Hallengren, B.; A. Forsgren; A. Melander*: Effects of antithyroid drugs on lymphocyte function in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 51: 298, 1980.
18. *Hardisty, C. A.; D. S. Hanford; Munro*: The prediction of relapse after drug treatment of Graves' disease by assay of long acting thyroid stimulator protector (LATS-P). *Clin Endocrinol* 14: 509, 1981.
19. *Teng, C. S.; R. T. T. Yeung*: Changes in thyroid stimulating antibody activity in Graves' disease treated with antithyroid drugs and its relationship to subsequent relapse: A prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 50: 144, 1980.

Recibido: 18 de febrero de 1982.

Aprobado: 4 de marzo de 1982.

Dr. *Angel Uñarte Rubio*
 Instituto Nacional de Endocrinología y
 metabolismo
 Zapata y C. Vedado. Ciudad de La Habana.