

Aumento in vitro de la producción de factor estimulante de colonias por células mononucleares de sangre periférica en los pacientes con síndrome de hiperinmunoglobulinemia E

Martha F. Rodríguez, Pablo J. Patiño, Fernando Montoya, Diana García de Olarte

Objetivos: analizar el comportamiento *in vitro* de varias citoquinas relacionadas con la respuesta inmune en pacientes con SHIE, con asma alérgica y en sujetos normales.

Métodos: se analizó la respuesta proliferativa de las células mononucleares en respuesta a mitógeno y a antígenos específicos por medio de la incorporación de timidina tritiada. También se evaluó la producción de citoquinas por estas células después del estímulo *in vitro* con fitohemaglutinina (PHA) y tres antígenos diferentes a través de ELISA en los sobrenadantes y de slot-blot del ARN total.

Resultados: en los pacientes con SHIE se encontró un aumento significativo de producción del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) en los cultivos de

células mononucleares estimulados o no con nitrógeno o antígenos. No se encontraron alteraciones en la producción de IL-2, IFN- γ , IL-12p40, IL-4, IL-10 y TNF- α .

De otro lado, en los pacientes asmáticos se evidenció un patrón de secreción de citoquinas TH2 cuando los cultivos fueron estimulados con PHA o con *D. pteronyssinus*. Además, los pacientes con SHIE presentaron disminución marcada de la respuesta linfoproliferativa cuando al estimular las células mononucleares con antígenos específicos, pero fue normal ante mitógenos.

Conclusiones: sugerimos que el aumento del GM-CSF en el SHIE puede ser un marcador de respuesta inflamatoria no regulada, debido a un defecto en la activación de células T específicas, que lleva a la persistencia del antígeno o al efecto de otros mediadores liberados de células inflamatorias en respuesta a la interacción de IgE y antígenos.

Introducción

El SHIE es una inmunodeficiencia primaria que se inicia a edad temprana, se caracteriza por niveles séricos de IgE muy elevados (mayores de 2000 UI/mL), alto porcentaje de IgE específica contra *Staphylococcus aureus* (aproximadamente 20% de la IgE total) (1), infecciones sinopulmonares recurrentes, abscesos cutáneos fríos y eczema severo en piel y cuero cabelludo. Las infecciones son causadas principalmente por *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* tipo b. Aunque los niveles de IgE son muy altos, es de anotar que son muy raras las manifestaciones clínicas de atopia en estos pacientes (1-3). Además, presentan eosinofilia moderada en sangre y esputo (1), aumento de linfocitos B y monocitos CD23+ (4) y alteraciones en la función de los polimorfonucleares (PMN) como un defecto variable en la

Dres. Martha F. Rodríguez, Pablo J. Patiño, Fernando Montoya, Diana García de Olarte: Laboratorio de Inmunología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Medellín.

quimiotaxis y un incremento en la actividad metabólica, sin alteración de la fagocitosis (5-7). En la inmunidad mediada por células T, los pacientes tienen defectos en la respuesta antígeno específica, tanto *in vivo* como *in vitro*, con una blastogénesis normal frente a mitógenos, subpoblaciones de linfocitos normales (1-3) y disminución del porcentaje de células T CD45RO, fenotipo de memoria (8).

Aunque los sobrenadantes de cultivos de linfocitos T de pacientes con SHIE inducen la síntesis de IgE en células B alogénicas normales (9), no se han demostrado alteraciones en la producción de interleuquina 4 (IL-4), IL-2 o interferón γ (IFN- γ) en cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con SHIE estimulados con mitógenos; además, la adición de IFN- γ recombinante o de anticuerpos contra IL-4 o IL-6 no disminuyen significativamente la síntesis espontánea de IgE en estos cultivos (10). Otros investigadores han informado que el tratamiento con IFN- γ *in vivo* e *in vitro* reduce la síntesis espontánea de IgE y los niveles séricos de esta inmunoglobulina en un grupo de pacientes; sin embargo, no hubo diferencias entre la producción de IFN- γ por CMSP de los pacientes estimulados con PHA o concanavalina A y los controles (11). El análisis de clonas de células T de pacientes con SHIE ha mostrado una disminución de la proporción de linfocitos T capaces de producir IFN- γ y TNF- α en respuesta a PHA, sin alteración en la proporción de linfocitos T productores de IL-4 e IL-2 frente al mismo estímulo (12). Estos hallazgos han lleva-

do a sugerir que estos pacientes tienen defectos en la activación y función de las subpoblaciones de los linfocitos T ayudadores (TH) (13, 14).

Con el fin de establecer si existe o no alguna anomalía en la regulación de la respuesta inmune en los pacientes con SHIE, determinamos la producción de IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , IL-12, TNF- α y GM-CSF. Estas citoquinas influyen en la polarización de las subclases de linfocitos TH así: la IL-12 y el IFN- γ inducen la diferenciación hacia TH₁, mientras que la IL-4 promueve la diferenciación a TH₂ y la IL-10 regula negativamente la producción de IFN- γ y por lo tanto favorece el patrón TH₂ (15,16). Además la IL-4 y el IFN- γ controlan positiva y negativamente la expresión de IgE (13,17). La IL-2, por su parte es el factor de crecimiento esencial para la generación de linfocitos TH efectoros (16). Finalmente, el TNF- α y el GM-CSF son mediadores importantes de la inflamación y están involucrados en el daño tisular observado en los pacientes asmáticos (18). El GM-CSF estimula la eosinofilia *in vivo* y prolonga la supervivencia y función de los eosinófilos *in vitro* (19,20), incrementa la explosión respiratoria de los neutrófilos (21), aumenta su adherencia *in vivo* e *in vitro* (22), aumenta la liberación de histamina por los mastocitos (23) y la expresión de CD23 en monocitos (24), sugiriendo que esta última citoquina juega un papel relevante en la fisiopatología del SHIE.

Material y método

Población de estudio

Se estudiaron dos pacientes con SHIE, diagnosticado de acuerdo

con los criterios de Buckley (3). Incluimos nueve pacientes con asma alérgica (tres hombres y seis mujeres) sin tratamiento con drogas sistémicas y con prueba de hipersensibilidad inmediata positivas para *D. pteronyssinus*, esto con el objeto de comparar el patrón de citoquinas obtenido en nuestros pacientes con SHIE con el de sujetos asmáticos en quienes se ha descrito un patrón preferencial TH₂ (25). Además se analizaron siete sujetos normales (cuatro hombres y tres mujeres) que no presentaban ningún tipo de patología, con pruebas de hipersensibilidad inmediata negativa para *D. pteronyssinus*. En el primer grupo se repitieron tres veces cada prueba. Todos los sujetos fueron vacunados con toxoide tetánico seis meses antes de iniciar los experimentos.

Cultivos de células mononucleares para el estudio de citoquinas

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) fueron obtenidas a partir de sangre venosa anticoagulada con heparina mediante sedimentación de los glóbulos rojos con dextran 70 al 6% (Pharmacia, Uppsala, Sweden) y posterior centrifugación en un gradiente de histopaque (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) 15 min/400 xg/temperatura ambiente (26). Luego, las células se lavaron tres veces con tampón fosfato salino (Dulbecco's PBS, Gibco-BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD). Finalmente, se cultivaron 1×10^7 células en 4 mL de RPMI1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina (Sigma), 5.95 g/L de hepes (Sigma), 2 g/L de bicar-

bonato de sodio (Sigma), 10% de una mezcla de sueros humanos inactivada, 50 µg/mL de gentamicina y 100 U/mL de penicilina (Gibco-BRL), a 37°C/5% CO₂, en condiciones de humedad. Las células fueron estimuladas o no, con 10 µg/mL de toxoide tetánico (Connaught Laboratories, Siwftwater, PA), 10 µg/ml de candidina (Miles, Elkhart, IN), 25 µg/mL de *D. pteronyssinus* (Miles) o 5 µg/mL de PHA (Sigma). Después de 24 horas de incubación los sobrenadantes se colectaron y se guardaron a -70°C hasta su análisis. El botón celular se utilizó para la obtención del RNA.

Determinación de la linfoproliferación

En forma paralela a los cultivos anteriores, se cultivaron en microplatos de 96 pozos 1 x 10⁵ células en 200 µl de RPMI-1640 suplementado y se estimularon con los mismos antígenos y mitógeno descritos arriba usando concentraciones iguales. Se cultivaron a 37°C/5% CO₂ en condiciones de humedad. El tiempo de incubación fue establecido por curvas de calibración con CMSP de sujetos normales: nueve días para los cultivos con antígenos y cuatro días para los cultivos con PHA. Dieciocho horas antes de recolectar las células, se adicionaron 50 µl de timidina [³H] (Amersham, Little Chalfont, England) a una concentración de 10 µCi/mL en cada pozo. Las células se recolectaron sobre filtros de fibra de vidrio (Amersham) y se midió la radioactividad en un contador de centelleo B (Beckman LS 3801, Columbia, MD). Los resultados se informaron como índices mitóticos (27).

Cuantificación de IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α y GM-CSF

La producción de citoquinas se determinó en los sobrenadantes de cultivos de CMSP estimuladas o no, de pacientes y sujetos normales utilizando los siguientes estuches comerciales de ELISA: IL-2 (sensibilidad: 8.7 pg/mL), IL-4 (< 2 pg/mL), IL-10 (<5 pg/mL), IFN-γ (< 4 pg/mL), TNF-α (<1 pg / mL) (BioSource, Camarillo, CA) y GM-CSF (8 pg/mL) (Immuno-genetics, Zwijndrecht, Belgium).

Extracción de RNA total

Para extraer el RNA total se utilizó el reactivo Trizol (Gibco) de acuerdo con lo recomendado por el productor (28). Los botones de células se lisaron con 1 mL de Trizol por medio de pipeteo repetitivo, se agregaron 0.2 mL de cloroformo y se agitaron vigorosamente por 15 segundos, luego de lo cual el tubo se dejó reposar a temperatura ambiente durante dos a tres minutos. Estas muestras se centrifugaron a 12.000 xg/15 min/4°C y la fase acuosa e incolora se transfirió a un tubo nuevo. El RNA se incubó con isopropanol durante la noche a 4°C y se precipitó a 13.000 xg/15 min /4°C. Se permitió que se secase y se resuspendió en 50 µl de H₂O tratada con DEPC. La concentración de RNA se determinó por espectrofotometría en un Biochrom 4060 (PharmaciaLKB, Suecia).

Obtención de sondas

Las sondas de DNA humano utilizadas en este estudio fueron gentilmente cedidas por el Dr. Laurence Kedes (B-actina) del Institute for Genetics Medicine, University of Southern Cali-

fornia, por los doctores Howard Young y Augusto Ochoa (L-4 e IFN-γ), del Biological Response Modifiers Program, National Cancer Institute y por Genetics Institute (Inc. (IL-12p40). Estas sondas de DNA se amplificaron en bacterias (29) y la purificación de los plásmidos se hizo por medio del estuche comercial Wizard Purification System (Promega, Madison, WI). Los plásmidos se linearizaron con las enzimas de restricción correspondientes así: β-actina: vector PBR, sitio de excisión BamHI, tamaño del inserto 2 Kb, IL-4: vector pCD, sitio de excisión XhoI, tamaño del inserto 0.8 Kb, IFN-γ: vector pUC9, sitio de excisión Ava I/HincII, tamaño del inserto ~1 Kb e IL-12 p40: vector pED (EMC), sitio de excisión XbaI. tamaño del inserto 2.3 Kb (New England Bio-Labs, Beverly, MA).

Slot blot de RNA e hibridación con las sondas de citoquinas

Las muestras de RNA se desnaturalizaron con 66% de formamida, 8% de formaldehído y 1.3 M de MOPS a 68°C/15 min. Luego se depositaron sobre un filtro de nylon, Hybon N (Amersham) usando un dispensador de muestras (Gibco-BRL). El RNA desnaturalizado se secó a temperatura ambiente sobre un papel Whatman 3M y se fijó horneando durante 2h a 80°C (30). El RNA obtenido de los cultivos estimulados con PHA y toxoide tetánico se hibridó con las sondas de IL12p40 y β-actina y se detectó por medio de quimioluminiscencia, usando el estuche ECL versión II (Amersham). El RNA de cultivos estimulados o no con *D. pteronyssinus* se hibridó con las sondas de IL-4,

IFN- γ y β -actina marcadas con $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP (Amersham, actividad específica $>10^8$ dpm/ μg) las cuales se marcaron por el método de *random primers*. Cada filtro se humedeció en SSC 6X, se colocó en una bolsa de hibridación, se adicionaron 20 mL de la solución de prehibridación (SSC 5X, Denhardt 5X, formamida 50%, SDS 1 % y 100 $\mu\text{g/mL}$ de esperma de salmón desnaturalizado) y se incubó tres horas a 2°C a rotación continua. La sonda marcada se desnaturalizó por 10 min/100°C, se adicionó a la bolsa con la membrana y se hibridó toda la noche. Los filtros se lavaron dos veces con 2X SSC/SDS 0.1% por cinco min a temperatura ambiente, dos veces más con 0.1X SSC/SDS 0.1% por 15 min/68°C y una última vez con 2X SSC a temperatura ambiente. Las membranas se expusieron sobre películas para rayos X. Los RNA detectados en las autorradiografías se cuantificaron por densitometría, utilizando un 300 Series Computing Densitometer, Image Quant V3.3 (Molecular Dynamics Inc, Sunnyvale, California).

Análisis estadístico

Para la respuesta proliferativa ante mitógeno y antígenos se determinó la media de los índices mitóticos de los cultivos; pacientes y controles se contrastaron por medio de la prueba de Mann Whitney. La producción de cada citoquina en los sobrenadantes también se analizó mediante la prueba de Mann Whitney, comparando la media de los valores obtenidos entre los asmáticos y controles y de las tres repeticiones de cada paciente con SHIE y controles. Para el análisis estadístico del "slot blot" en la detección del RNA específico,

Estímulo	Individuos	No. de sujetos ^a	Índices mitóticos ($\bar{X} \pm \text{EE}$) ^b
PHA	SHIE1	6	75.6 $\pm$ 12.2
	SHIE2	4	61.8 $\pm$ 7.6
	Asmáticos	10	77.2 $\pm$ 13.5
	Controles	8	62.8 $\pm$ 11.9
<i>C. albicans</i>	SHIE1	6	0.8 $\pm$ 0.1 ^c
	SHIE2	4	4.9 $\pm$ 1.3d
	Asmáticos	10	7.4 $\pm$ 1.6
	Controles	8	11.1 $\pm$ 2.0
<i>D. pteronyssinus</i>	SHIE1	6	1.5 $\pm$ 0.4 ^d
	SHIE2	4	1.6 $\pm$ 0.1
	Asmáticos	10	5.6 $\pm$ 1.8
	Controles	8	6.4 $\pm$ 1.7
Toxide tetánico	SHIE1	6	0.8 $\pm$ 0.1 ^c
	SHIE2	4	1.2 $\pm$ 0.3 ^c
	Asmáticos	10	5.0 $\pm$ 1.5
	Controles	8	14.0 $\pm$ 3.4

^a En los pacientes con el síndrome de HIE, este dato indica el número de repeticiones por cada paciente.

^b Los resultados se presentan como la media $\pm$ error estándar.

^c $p < 0.001$, ^d $p < 0.05$, ^e $p < 0.01$, diferencias significativas con respecto a los controles.

Tabla 1. Respuesta proliferativa de CMSP de pacientes y controles ante diferentes estímulos.

se utilizó el ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis, se confrontaron las áreas de densitometría de los individuos de cada uno de los grupos de estudio.

Resultados

Respuesta proliferativa frente a PHA y antígenos específicos

Para determinar la respuesta proliferativa de los linfocitos a la activación específica (antígenos) e inespecífica (mitógeno), se evaluó la incorporación de timidina tritiada en cultivos de CMSP en presencia de diferentes estímulos. La respuesta proliferativa a la PHA fue normal y no se encontró ninguna diferencia significativa entre los tres grupos estudiados. En cambio la blastogénesis de células mononucleares fue significativamente más baja en los pacientes con SHIE respecto a la respuesta de los controles, cuando las células se estimularon con

toxide tetánico ($p < 0.01$), *D. pteronyssinus* ($p < 0.05$) o *C. albicans* ($p < 0.001$ en SHIE1 y $p < 0.05$ en SHIE2). Los pacientes asmáticos respondieron de manera similar que los controles frente a los antígenos (Tabla 1).

Producción de citoquinas en sobrenadantes

Con el fin de evaluar si en los pacientes con SHIE era posible evidenciar un patrón definido de citoquinas después del estímulo de los linfocitos T, se cuantificaron los niveles de IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , GM-CSF y TNF- α en los sobrenadantes de los cultivos en respuesta a PHA y a antígenos específicos. En los pacientes con asma alérgica se detectó un aumento significativo ($p < 0.005$) de la producción de IL-4 después del estímulo con PHA y disminución significativa ($p < 0.05$) en la producción de IFN- γ con res-

Factor estimulante de colonias en SHIE

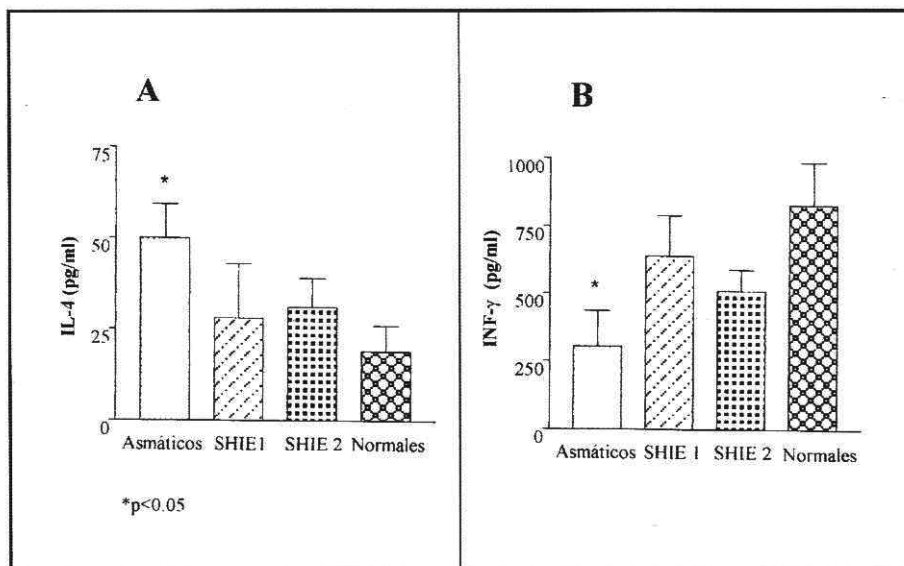


Figura 1. Las concentraciones de IL-4 (A) e IFN- γ (B) fueron cuantificadas por medio de ELISA en los sobrenadantes de los cultivos de CMSP. Las células de los dos pacientes con SHIE (tres muestras diferentes por cada paciente), de nueve pacientes con asma alérgica y de siete sujetos normales se estimularon o no con *Candidina*, *D. pteronyssinus*, toxoide tetánico o PHA durante 24 horas. Los resultados se presentan como las medias $\pm$ error estándar. * $p<0.05$.

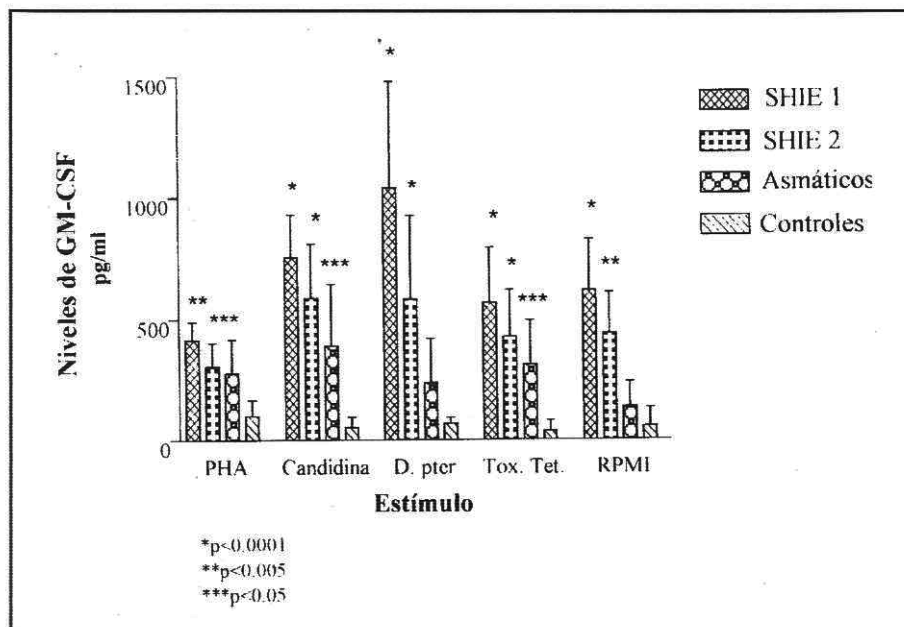


Figura 2. Niveles de GM-CSF en los sobrenadantes de cultivos de CMSP estimulados durante 24 horas en presencia o no de *Candidina*, *D. pteronyssinus*, toxoide tetánico o PHA. La cuantificación se realizó en tres muestras diferentes de cada paciente con SHIE, nueve pacientes asmáticos y siete individuos normales por medio de un método de ELISA. Los resultados se presentan como la media $\pm$ error estándar. Diferencias significativas en la producción de GMCSF con respecto a los controles: * $p<0.0001$, ** $p<0.005$, *** $p<0.05$.

pecto al grupo control usando el mismo estímulo (Figura 1). Por su parte, en los pacientes con SHIE no se evidenciaron diferencias significativas en la producción de IL-4 e IFN- γ con respecto a los sujetos controles; sin embargo, en ellos se encontró un marcado aumento de la producción de GM-CSF con respecto al grupo control, tanto en los sobrenadantes de los cultivos sin estímulo, como en los tratados con PHA ($p<0.005$ SHIE 1 y $p<0.05$ en SHIE2), *C. albicans* ($p<0.0001$), *D. pteronyssinus* ($p<0.0001$) y toxoide tetánico ($p<0.0001$). En los pacientes con asma alérgica también se observó un aumento significativo en la producción de esta citoquina en los cultivos estimulados con PHA ($p<0.051$), *C. albicans* ($p<0.05$) y toxoide tetánico ($p<0.05$) (Figura 2). No hubo diferencias significativas en las concentraciones de IL-2, TNF- α e IL-10 en los sobrenadantes al comparar los pacientes con SHIE, los asmáticos y sus respectivos controles (no se muestran datos).

Detección de RNA para IL-12p40, IL-4 e IFN- γ

Puesto que la síntesis de las proteínas y en particular de las citoquinas tiene diferentes niveles de regulación, evaluamos la expresión del RNA para diferentes citoquinas por medio de una técnica de *slot-blot*, con el fin de detectar posibles diferencias en la transcripción de los respectivos genes entre los pacientes y los controles. La producción de IL-4 e IFN- γ se analizó en los cultivos estimulados o no, con *D. pteronyssinus*. En los pacientes asmáticos se encontró un aumento significativo

de la producción de RNA para IL-4 ($p<0.05$) (Figura 3A) y disminución significativa del RNA para IFN- γ ($p<0.05$) en respuesta al *D. pteronyssinus* (Figura 3B), mientras que los pacientes con SHIE no revelaron diferencias significativas en los niveles de RNA para ambas citoquinas. En las células obtenidas de los cultivos sin estímulo no hubo diferencias significativas en la expresión del RNA para IL-4 e IFN- γ entre los grupos analizados. Finalmente, no se encontraron diferencias significativas en la producción de RNA específico para IL-12p40 en respuesta a PHA o toxoide tetánico (datos no mostrados).

Discusión

Investigamos el comportamiento funcional de los linfocitos T en el SHIE y en pacientes con asma alérgica, como modelos de alteración en la regulación de la síntesis de IgE. En los primeros esta alteración se acompaña de un defecto severo en la respuesta inmune ante ciertos gérmenes y por lo tanto de un cuadro de infección recurrente (1,2), mientras que en los pacientes con asma alérgica el defecto de la inmunorregulación de la IgE está restringido a ciertos alérgenos y aunque no se asocia a un cuadro clínico de inmunodeficiencia, sí se propone que la producción exagerada de IgE en pacientes atópicos puede resultar de una deficiencia en las células o factores que regulan negativamente la síntesis de IgE (3, 31). En los sujetos con asma alérgica encontramos un aumento y disminución significativos en la transcripción y síntesis de la IL-4 y el IFN- γ respectivamente, cuando las células mononucleares fue-

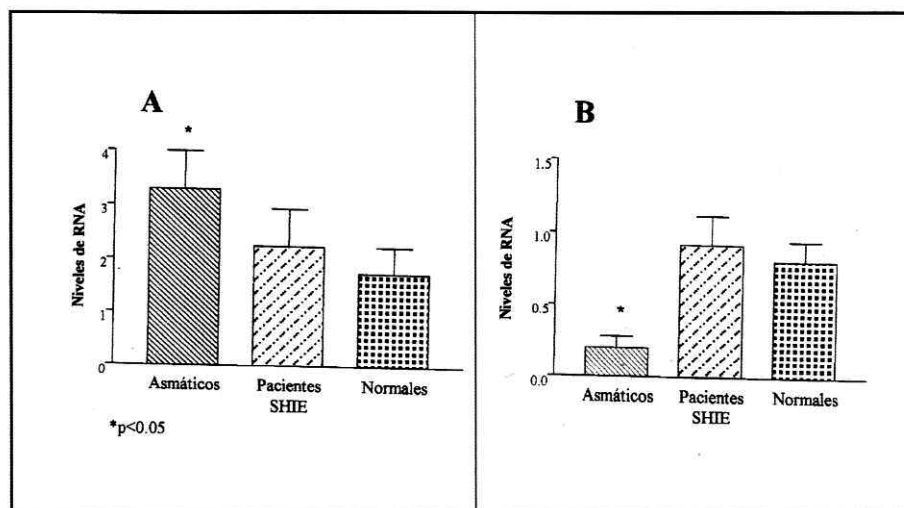


Figura 3. Análisis de las áreas densitométricas de la expresión del RNA de IL-4 (A) e IFN- γ (B) en respuesta a *D. pteronyssinus* en pacientes y controles. La gráfica muestra la media y el error estándar del área densitométrica para cada uno de los grupos analizados. Se observa un aumento significativo de la producción del RNA de IL-4 y disminución del RNA de IFN- γ en células mononucleares de los pacientes asmáticos. * $p<0.05$.

ron estimuladas con PHA, lo cual establece un patrón de respuesta TH₂, que predomina en las enfermedades atópicas (2,16,25). Por el contrario, en los pacientes con SHIE claramente se observó que no había diferencias en la síntesis de estas citoquinas, corroborando lo reportado por Vercelli y cols, quienes no evidenciaron ninguna diferencia en la síntesis de IL-4 o IFN- γ (10). De otro lado, no hubo diferencias significativas en la producción de IL-12, IL-10, IL-2 o TNF- α entre los dos grupos de pacientes y los controles; estas citoquinas son importantes en el establecimiento de las subpoblaciones de células TH (15, 16). De lo anterior se puede concluir que en nuestros pacientes con SHIE no existe un patrón definido de citoquinas durante la respuesta inmune ante los antígenos usados en este estudio.

El GM-CSF fue la única citoquina alterada en nuestros pacientes con el SHIE. Se observó un aumento significativo en todos

los cultivos, inclusive en los cultivos sin estímulo, indicando una condición establecida *in vivo*. Estos niveles elevados de GM-CSF pueden ser consecuencia de la recurrencia y persistencia de las infecciones que sufren estos pacientes. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la histamina induce la síntesis de GM-CSF por parte de células mononucleares (32), y en los pacientes con SHIE hay una alta concentración de IgE antígeno específica que induce la degranulación de mastocitos y por lo tanto liberación de histamina (2). Esta afirmación está de acuerdo con el hallazgo de que los pacientes con asma alérgica también presentaron un aumento significativo de la producción de GM-CSF en los cultivos de células mononucleares, aunque el incremento no fue tan marcado como en los pacientes con SHIE. De otro lado, en los pacientes alérgicos se ha demostrado el aumento de esta citoquina (33, 34), lo cual contribuye a la cronicidad de estas en-

fermedades inflamatorias por su acción sobre diversas células, pues estimula la acumulación y activación de los eosinófilos (19, 22), potencia la liberación de mediadores de la inflamación (23, 24, 34, 35), y activa y aumenta la sobrevivencia de los macrófagos (33). Es probable que el GM-CSF tenga efectos similares en el SHIE. La alteración de la regulación de la síntesis de IgE en las dos patologías analizadas en este estudio, es completamente diferente. En los asmáticos la hiperproducción de IgE depende de la interacción física entre células T y B a través de la unión de CD40 y CD40L (36) así como del aumento de la síntesis de IL-4 por las células T (25); por lo tanto depende básicamente de las células TH₂ y las manifestaciones clínicas de estos pacientes se correlacionan con los efectos de las citoquinas secretadas por esta subpoblación (5, 37). En cambio en el SHIE se ha reportado que el aumento de la IgE es independiente de las interacciones celulares, de la IL-4 endógena y de la regulación negativa por el IFN- γ (12). De otro lado, la disminución de la respuesta proliferativa frente a los antígenos toxoide tetánico, *C. albicans* y *D. pteronyssinus* en los pacientes con SHIE, sin alteración de la proliferación ante el estímulo con PHA es un fenómeno bastante interesante. Estos hallazgos han sido reportados en todos los pacientes con SHIE (1-3) y se correlacionan con la disminución del porcentaje de células T de memoria, reportado por Buckley (8). Esto puede ser consecuencia de un defecto en las señales de activación de los linfocitos T durante el reconocimiento antigénico o

de una alteración en el procesamiento o presentación de ciertos antígenos por parte de la célula presentadora de antígeno.

De acuerdo con los hallazgos del presente estudio y lo informado en la literatura, proponemos que el defecto en el SHIE puede radicar en una falla en la activación de los linfocitos TH, que afecta el establecimiento de las células T de memoria, posiblemente acompañado de la falta de polarización hacia uno de los fenotipos TH₁ y TH₂. El defecto en la memoria se manifiesta en las infecciones recurrentes. Además, en la síntesis exagerada de IgE podría estar participando la IL-13 u otra citoquina involucrada en la modulación positiva de esta inmunoglobulina. Recientemente se ha demostrado que las células T CD4⁺, CD-45R0⁻ (linfocitos T vírgenes) inducen eficientemente la producción de IgE vía IL-13, lo cual no fue afectado por el IFN- γ ni por anticuerpos contra la IL-4; además la inducción de la IgE pudo ser transferida con sobrenadantes de cultivos (38). El aumento en el GM-CSF y posiblemente de otras citoquinas proinflamatorias quizá es secundario a la persistencia del antígeno, debido al defecto en la activación de los linfocitos TH, y a la liberación de histamina desde los mastocitos. A su vez, este factor contribuye al daño tisular y tal vez promueve la producción de IL-13 como mecanismo regulador de inflamación.

Summary

Hyperimmunoglobulinemia E (HIE) syndrome, which cause is unknown, is a primary immunodeficiency characterized by high levels of IgE, severe recurrent

infections and defects in the immune response mediated by T cells. In order to evaluate the cytokine profile of mononuclear cells and its possible involvement in pathogenesis of defects with alteration of IgE regulation, we studied the *in vitro* behavior of some cytokines in patients with HIE syndrome, allergic asthma and normal subjects. The lymphoproliferative response of mononuclear cells upon mitogen and antigen stimulation was evaluated by H³-thymidine incorporation. The cytokine profile of mononuclear cells isolated of these patients and cultured in presence of different stimuli was determined by ELISA of supernatants and slot-blot of total RNA. Our HIE syndrome patients showed a significant increase in the production of GM-CSF in cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated or not with tetanus toxoid, *Candida albicans*, *Dermatophagoides pteronyssinus* and PHA. No alterations were observed in the production of: IL-2, INF- γ , IL-12p40, IL-4, IL-10 and TNF- α . Moreover, these patients showed an impaired lymphoproliferative response to specific antigens, whereas PHA induced a normal response. In asthmatic patients a TH₂ pattern of cytokines was established in cultures of PBMC stimulated with PHA and *Dermatophagoides pteronyssinus*: a significant increase of IL-4 and decrease INF- γ were observed. It is suggested that the immune defect in HIE syndrome might reside in some failure in the activation of TH cells, possibly accompanied by the lack of polarization toward phenotypes TH₁ and TH₂, affecting the establish-

ment of memory T cells. The high levels of GM-CSF in HIE syndrome can be secondary to antigen persistence due to a defect in the activation of T_H cells. GM-CSF would contribute to eosinophilia and tissue damage that accompany recurrent infections in hyperIgE patients.

Agradecimientos

Agradecemos a la profesora Fabiola Toro, al Dr. Juan E. Pérez y al biólogo Juan A. López por su ayuda técnica. Este trabajo de investigación fue posible gracias a la financiación de Colciencias y de la Vicerrectoría de Investigaciones (CODI) de la Universidad de Antioquia.

Referencias

1. Donabedian H, Gallin J. The Hyperimmunoglobulin E recurrent-infection (Job's) syndrome. *Medicine* 1983; 62: 195-208.
2. Buckley R. IgE disorders. In: Rich RR, Fleisher TA, Schwartz BD, Shearer WT, Strober W, eds. *Clinical Immunology. Principles and practice*. St. Louis: Mosby; 1996: 694-706.
3. Buckley R, Becker G. Abnormalities in the regulation of human IgE synthesis. *Immunol Rev* 1978; 41: 289-314.
4. Souillet G, Rousset F, De Vries J. Alpha-interferon treatment of patient with hyper IgE syndrome. *Lancet* 1989; 1384.
5. Isserut A, Biggar D. Neutrophil Chemotaxis in two patients with recurrent staphylococcal skin infections and hyperimmunoglobulin E. *J Lab Clin Med* 1978; 92: 640-647.
6. Hill H, Ochs H, Quie P, Clark R, Pabst H, Klebanoff S, Wendgwood R. Defect in neutrophil granulocyte Chemotaxis in Job's syndrome of recurrent "cold" staphylococcal abscesses. *Lancet* 1974; 617-623.
7. Hill H, Estensen R, Hogan N, Quie P. Severe staphylococcal disease associated with allergic manifestations, hyperimmunoglobulinemia E. and defective neutrophil Chemotaxis. *J Lab Clin Med* 1976; 88: 796-806.
8. Buckley RH, Schiff SE, Hayward AR. Reduced frequency of CD45RO+ T lymphocytes in blood of hyperIgE syndrome patients. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 313 (abst).
9. Saryan J, Leung D, Geha R. Induction of human IgE synthesis by a factor derived from T cells of patients with hyper-IgE states. *J Immunol* 1983; 130: 242-247.
10. Vercelli D, Jabara H, Cunningham-Rundles C, et al. Regulation of Immunoglobulin (Ig) E synthesis in the hyper-IgE syndrome. *Clin Invest* 1990; 85: 1666-1671.
11. King C, Gallin J, Malech H, Abramson S, Nutman T. Regulation of immunoglobulin production in hyperimmunoglobulin E recurrent-infection syndrome by interferon γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 10085-10089.
12. Del Prete G, Tiri A, Maggi E, et al. Defective in vitro production of g-interferon and tumor necrosis factor- α by circulation T cells from patients with hyperimmunoglobulin E syndrome. *J Clin Invest* 1989; 84: 1830-1835.
13. Vercelli D, Geha R. Regulation of IgE synthesis in humans: a tale of two signals. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 285-295.
14. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Ann Rev Immunol* 1994; 12: 227-257.
15. Paul W, Seder R. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994; 76: 241-251.
16. Seder R, Paul W. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Ann Rev Immunol* 1994; 12: 635-673.
17. Zurawski G, Vries J. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today* 1994; 15: 19-26.
18. Corrigan C. Allergy of the respiratory tract. *Curr Opin Immunol* 1992; 4: 798-804.
19. Howard MC, Miyajima A, Coffman R. T-cell derived cytokines and their receptors. In: Paul W, ed. *Fundamental Immunology*. New York: Raven Press 1993; 763-800.
20. Kita H, Ohnishi T, Okubo Y, Weiler D, Abrams JS, Gleich G. Granulocyte/macrophage colony stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J Exp Med* 1991; 174: 745-748.
21. Khwaja A, Carver J, Linch D. Interactions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF), granulocyte CSF, and tumor necrosis factor α in the priming of the neutrophil respiratory burst. *Blood* 1992; 79: 745-753.
22. Yong K, Rowles P, Patterson K, Linch D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces neutrophil adhesion to pulmonary vascular endothelium in vivo: role of β -2 integrins. *Blood* 1992; 80: 1565-1575.
23. Columbo M, Horowitz E, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein L. Histamine release from human basophils induced platelet activating factor: the role of extracellular calcium, interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Allerg Clin Immunol* 1995; 95: 565-573.
24. Alderson M, Armitage R, Tough T, Ziegler S. Synergistic effects of IL-4 and either GM-CSF or IL-3 on the induction of CD23 expression by human monocyte: regulatory effects of IFN α and IFN γ . *Cytokine* 1994; 6: 407-413.
25. Wierenga E, Snoek M, Jansen H, Bos J, Van Lier R, Kapsenberg M. Human atopic-specific types 1 and 2 T helper cell clones. *J Immunol* 1991; 147: 2942-2949.
26. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Invest* 1968; 21: 77-89.
27. Maluish A, Strong D, Rose N, Friedman H, Fahey J, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3a ed. Washington D.C. American Society for Microbiology; 1989:274-281.
28. Chomczynski P, Sacchi N. Rapid and quantitative preparation of total RNA from small numbers cells. *Anal Bioch* 1987; 162: 156-159.
29. Sambrook J, Fritsch E.F, Maniatis T, eds. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 1.21 - 1.24.
30. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, eds. *Analysis of RNA by northern and slot blot hybridization*. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., 1994: 4.9.1-4.9.14.
31. Buckley RH. Immunologic deficiency and allergic disease. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy. Principles and practice*. St. Louis; Mosby; 1993: 1007-1026.
32. Mor S, Nagler A, Barak V, Handzel ZT, Geller-Bernstein C, Fabian I. Histamine enhances granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 production by human peripheral blood mononuclear cells. *J Leukocyte Biol* 1995; 58: 445-450.
33. Bratton D, Qutayba H, Boguniewicz M, Doherty D, Kailey J, Leung D. Granulocyte macrophage colony stimulating factor contributes to enhanced monocyte survival in chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest* 1995; 95: 211-218.
34. Hallsworth M, Soh C, Lane S, Arm J, Lee T. Selective enhancement of GM-CSF, TNF- α , IL-1 β and IL-8 production by monocytes and macrophages of asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1994; 7: 1096-1102.
35. Matz J, Williams J, Rosaenwasser L, Borish L. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor stimulates macrophages to respond to IgE via the low affinity IgE receptor. *Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 650-657.
36. Lu P, Urban JF, Zhou XD, et al. CD40-mediated stimulation contributes to lymphocyte proliferation antibody production, eosinophilia, and mastocytosis during in vivo type 2 response, but is not required for T cell IL-4 production. *J Immunol* 1996; 156: 3327-3333.
37. Plaut M. Antigen-specific lymphokine secretory patterns in atopic disease. *J Immunol* 1990; 144: 4497-4500.
38. Brinkmann V, Kristofic C. TCR-stimulated naive human CD4+45RO- T cell develop into effector cells that secrete IL-13, IL-5 and IFN- γ but no IL-4 and help efficient IgE production by B cells. *J Immunol* 1995; 154: 3078-3087.