

Utilidad diagnóstica de la evaluación de linfocitos T CD4⁻ CD8⁻ TCRαβ⁺ en el Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune

Diagnostic utility of the assessment of CD4-CD8-TCRαβ + lymphocytes in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome

AL DIRECTOR:

La acumulación de células T CD3⁺ CD4⁻ y CD8⁻ (DNT), TCRαβ⁺, es un hito del síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS). El origen y la diferenciación de las DNT permanecen controversiales ¹.

El ALPS es un desorden de la homeostasia de linfocitos asociado con mutaciones en genes involucrados en la vía Fas de la apoptosis y tiene una herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta. La mayoría de los pacientes poseen mutación heterocigótica en los genes FAS; mientras que un menor número de ellos, presenta la alteración a nivel del ligando FAS o en los genes que codifican para las caspasa 8 o 10, respectivamente. No obstante, la mutación causal se desconoce en una proporción importante de pacientes¹⁻⁵.

El protocolo diagnóstico del ALPS contempla como "criterios necesarios" el aumento de las DNT TCRαβ⁺ y la linfoproliferación (expresada como linfadenopatías, esplenomegalia, o ambas) de causa no infecciosa, ni maligna, de al menos 6 meses de evolución. Sin embargo, el diagnóstico definitivo requiere además de la presencia de los "criterios necesarios", un "criterio accesorio primario", que puede ser el déficit de apoptosis comprobada "*in vitro*" mediante dos determinaciones, las mutaciones somáticas o germinales en los genes (FAS, FASL, CASP 10), o ambas.

Cuando el paciente cumple los dos "criterios necesarios" y cualquiera de los criterios accesorios clasificados actualmente como secundarios, se considera como diagnóstico probable *de ALPS*. Entre estos se encuentran alguno de los siguientes marcadores elevados: sFAS-LG en plasma > 200 pg/mL, IL-10 > 20 pg/mL, Vitamina B12 > 1 500 ng/L, IL-18 > 500 pg/mL, una biopsia con hallazgos histológicos compatibles con ALPS, hipergammaglobulinemia y citopenias inmunes y una historia familiar de ALPS o linfoproliferación no maligna².

Por constituir un aspecto imprescindible en el diagnóstico de esta enfermedad, se decide incorporar en el laboratorio de Inmunología del Instituto de Hematología e Inmunología el estudio de los linfocitos DNT TCRαβ⁺.

Se tomó como referencia un paciente con diagnóstico de síndrome de Evans-Fisher (SEF) que fue remitido al laboratorio para realizarle estudios de la inmunidad. En la evaluación de la historia de la enfermedad, se observaron datos clínicos que sugirieron la posibilidad de que el paciente presentara un ALPS, por lo que se decidió incorporar como parte del estudio, la cuantificación de los DNT TCR $\alpha\beta^+$.

Entre los hallazgos clínicos más significativos se encontraron: la presencia de sepsis grave desde lactante, la anemia intensa y trombocitopenia grave, con prueba de autoanticuerpos positivos: Coombs directo y anticuerpos antiplaquetarios; y estudios negativos para citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y herpesvirus realizados por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). También se constató un síndrome adénico, cuyo estudio histopatológicamente reveló la presencia de hiperplasia paracortical e inmunohistoquímica positiva para los antígenos CD3, CD5, CD20 y CD21 en los folículos linfoides.

Citometría de flujo para DNT TCR $\alpha\beta^+$

La técnica se desarrolló teniendo en cuenta el protocolo descrito en el Hospital Vall D'Hebron de Barcelona, adaptado según las condiciones específicas del laboratorio.

El ensayo incluyó el uso de un control sano, con fines de establecer puntos de comparación. Ambas muestras (control y paciente) fueron procesadas al unísono para garantizar reproducibilidad.

Se usaron los anticuerpos monoclonales (AcMo) anti-CD4FITC/CD8PE/CD3PC5 triple marcado (Beckman Coulter) y el anti-TCR $\alpha\beta$ APC (Miltenyi Biotec).

Las muestras se analizaron en un citómetro Beckman Coulter Gallios, con el uso del programa Kaluza, versión 1.2.

La estrategia de análisis comprendió la formación de ventanas (*gate*) que se sobrelapan. Se evaluó la población DNT y en ella las células TCR $\alpha\beta^+$.

El inmunofenotipaje de las DNT características de ALPS requirió el uso de AcMo anti-TCR $\alpha\beta$, porque la mayoría de las DNT encontradas en controles normales son TCR $\gamma\delta^+$, lo cual no es relevante para establecer este diagnóstico³.

Se constató la presencia de una población DNT TCR $\alpha\beta^+$ que representó un 11,60 % en el paciente, en relación al 1,45 % en el control sano.

Los rangos normales para células dobles negativas TCR $\alpha\beta^+$ deben ser establecidos en cada laboratorio y varían entre ellos.

La definición actual aceptada para el diagnóstico de ALPS fue establecida en el Instituto Nacional de Salud de EUA, más del 1 % en la población de linfocitos totales es considerado anormal en adultos^{4,5}.

En el Hospital Pediátrico de Filadelfia se ha determinado que hasta 2,6 % es normal en individuos sanos⁴. Este criterio fue tomado como referencia, ante la ausencia de valores de referencia propios.

Los DNT ALPS difieren de la pequeña población de DNT fisiológicas encontradas en donantes sanos. Las primeras tienen un perfil transcripcional único y distintas propiedades funcionales, que incluyen el aumento de la expresión del ligando Fas e interleucina-10, de la capacidad proliferativa "*in vivo*" e hiperrespuesta "*in vitro*"¹.

Esto indica que la diferenciación de DNT es incluso más compleja, y que la deficiencia de Fas además de la regulación de la muerte de células T puede tener un impacto en la diferenciación de estas células¹.

Aunque es importante conocer los valores normales en un laboratorio particular, Oliveira y Fleisher no encontraron cambios relacionados con la edad en una serie de 29 controles sanos evaluados³.

La evaluación de DNT también demuestra ser una valiosa herramienta de pesquisa de ALPS en pacientes con SEF. Un estudio multicéntrico dirigido por el Children's Hospital of Philadelphia, que incluyó 45 niños con SEF procedentes de 22 instituciones, permitió diagnosticar ALPS en 47 % de los enfermos. Estos datos sugieren que los pacientes pediátricos con SEF deben ser investigados para ALPS con la determinación de DNT⁵.

Volkl y colaboradores investigaron la actividad de células DNT en pacientes con ALPS. Sorprendentemente, encontraron que estas células no son simplemente aquellas que se rehúsan a morir; también exhiben actividad mitótica sustancial que es dependiente de la activación de Akt (proteína quinasa serina/treonina, también llamada proteína quinasa B ó PKB) y mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero o "*mammalian target of Rapamycin*")^{3,6}.

Los autores identificaron una proliferación dependiente de mTOR en precursores DNT, lo que indica signos de daño en las células T aún antes del estado DNT⁷.

Las evidencias demuestran que las células DNT ALPS no están simplemente acumuladas en retiro senescente; ellas y sus precursores permanecen activas y proliferan bajo la influencia de señales de activación de mTOR⁷.

Se han publicado resultados muy interesantes en cuanto a la relación entre DNT TCR $\alpha\beta^+$ y enfermedades autoinmunes tales como: lupus eritematoso sistémico, enfermedad mixta del tejido conectivo, artritis juvenil idiopática y la inmunodeficiencia variable común^{7,8}. De manera general este biomarcador se encuentra elevado, pero la precisión de su función específica requerirá investigaciones adicionales que podrán ser abordadas en una comunicación posterior.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rensing-Ehl A, Volkl S, Speckmann C, Lorenz MR, Ritter J, Janda A, et al. Abnormally differentiated CD4⁺ or CD8⁺ T cells with phenotypic and genetic features of double negative T cells in human Fas deficiency. *Blood* 2014; 124(6):851-60. doi: 10.1182/blood-2014-03-564286.
2. Garrido Colino C. Avances en el conocimiento y manejo del síndrome linfoproliferativo autoinmune. *An Pediatr* 2014; 80(2):122e1-7.
3. Oliveira JB, Fleisher TA. Laboratory evaluation of primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125 (2Suppl2): S297-S305. doi:10.1016/j.jaci.2009.08.043.

4. Teachey DT, Manno CS, Axsom KM, Andrews T, Choi JK, Greenbaum BH, et al. Unmasking Evans syndrome: T-cell phenotype and apoptotic response reveal autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Blood* 2005; 105(6):2443-48. doi: 10.1182/blood-2004-09-3542.
5. Seif AE, Manno CS, Sheen C, Grupp SA, Teachey DT. Identifying autoimmune lymphoproliferative syndrome in children with Evans syndrome: a multi-institutional study. *Blood* 2010; 115(11):2142-5. doi: 10.1182/blood-2009-08-239525.
6. Vökl S, Rensing-Ehl A, Allgäuer A, Schreiner E, Lorenz MR, Rohr J. Hyperactive mTOR pathway promotes lymphoproliferation and abnormal differentiation in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* 2016; 128(2):227-38.
7. Roberts CA, Ayers L, Bateman EA, Sadler R, Magerus-Chatinet A, Rieux-Laucat F, et al. Investigation of common variable immunodeficiency patients and healthy individuals using autoimmune lymphoproliferative syndrome biomarkers. *Hum Immunol* 2013; 74(12): 1531-5. doi: 10.1016/j.humimm.2013.08.266.
8. Tarbox JA, Keppel MP, Topcagic N, Mackin C, Ben Abdallah M, Baszis KW, et al. Elevated Double Negative T Cells in Pediatric Autoimmunity. *J Clin Immunol* 2014; 34(5):594-9. doi:10.1007/s10875-014-0038-z.

**Imilla Casado Hernández, Vianed Marsán Suárez, Gabriela Díaz Domínguez,
Consuelo Macías Abraham**

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

Recibido: septiembre 30, 2016.
Aceptado: febrero 09, 2017.

Lic. Imilla Casado Hernández. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, CUBA.
Email: rchematologia@infomed.sld.cu