Diagnóstico por citometría de flujo del síndrome linfoproliferativo autoinmune

Casado-Hernández I, Marsán-Suárez V, Díaz-Domínguez G, Macías-Abraham C, Machín-García S
Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba.
Email: imilla@hemato.sld.cu

RESUMEN

La acumulación de células T $CD3^+/CD4^-CD8^-/TCR\alpha\beta^+$ es un hito en el Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune, el cual se caracteriza por un desorden de la homeostasis de linfocitos asociado con mutaciones en genes involucrados en la vía Fas de apoptosis. Por su relevancia en el diagnóstico de esta enfermedad y con el objetivo de constatar su utilidad diagnóstica, se incorpora en el Instituto de Hematología e Inmunología dicha determinación. Se tomó como referencia un paciente con Síndrome de Evans-Fisher que fue remitido al laboratorio para efectuarle estudios de la inmunidad celular; y que a la discusión colectiva mostró una serie de datos clínicos que sugirieron la posibilidad de que presentara un Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune. El estudio incluyó la cuantificación de linfocitos T doble negativos TCRαβ+, y un inmunofenotipo diseñado para evaluar la activación y diferenciación de células T, y la regulación de la respuesta inmune. Se constató la presencia de una población doble negativa $TCR\alpha\beta^+$ que representó un 11,60 % en el paciente, en relación con 1,45 % en el control sano. Se tomó como valor de referencia 2,5 % como límite superior de normalidad para células doble negativas $TCR\alpha\beta^+$, medidas sobre CD3+ en sangre periférica. La expansión inusual de esta población de células doble negativas maduras que expresan $TCR\alpha\beta^+$ rearreglado es un rasgo distintivo y diagnóstico de la enfermedad; y se corresponden con un fenotipo senescente, con débil modulación de sus correceptores CD4 y CD8. La evaluación global de la regulación de la respuesta inmune usando el Kit CD4/CD25/Foxp3, mostró una disminución de las células T $CD4^+CD25^+$ y de la expresión del factor de transcripción Foxp3, lo que conlleva a la autoinmunidad, específicamente mediada por células T $CD4^+$, y a la linfoproliferación. Se concluye que el paciente padece una enfermedad por inmunodeficiencia primaria: Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune.

Palabras clave: síndrome linfoproliferativo autoinmune, mutaciones FAS, apoptosis, linfocitos T doble negativos, TCRαβ+.

INTRODUCCIÓN

El síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS) es un desorden caracterizado por desregulación inmune debido a la ruptura de la homeostasis de linfocitos, que se produce como resultado de mutaciones en la vía apoptótica mediada por Fas. Esta enfermedad es a veces mal diagnosticada debido a su expresión fenotípica variable y al solapamiento de síntomas con otros muchos desórdenes hematológicos e inmunológicos.[1]

Al laboratorio llegó remitido un paciente con diagnóstico de síndrome de Evans- Fisher (SEF) para realizarle estudios de la inmunidad. Se trata de un paciente que desde la edad de lactante tuvo múltiples ingresos por sepsis graves, con anemia intensa y trombocitopenia severa.

En la evaluación de la historia de la enfermedad por el equipo de trabajo, se observaron una serie de 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 las células T CD3+CD4-CD8- (células T doble negativas ó DNT) que expresan TCRαβ+

Las vías de diferenciación de DNT TCRαβ+ y el papel de Fas en este proceso no están claros, algunos autores hipotetizan que pueden estar representadas por descendientes directos de células T simple positivas crónicamente activadas, con correceptores desregulados, en un estado de diferenciación en que eran destinados a perecer por apoptosis mediada por Fas.[1-4]

La población de células TCRαβ+ DNT requerida para el diagnóstico debe derivarse del estudio particular de cada laboratorio en sus poblaciones, pero diversos grupos de trabajo coinciden en que los valores límites patológicos son ≥ 1,5 % en linfocitos totales o ≥ 2,5 % en linfocitos CD3+. [4]

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. [5] Aunque numerosas deficiencias genéticas llevan a la linfoproliferación de células T, sólo aquella causada por una vía Fas defectuosa es dominada por células T doble negativas. [2]

En inmunología clínica la distinción entre células CD45RA+ y CD45RO+ es particularmente útil para determinar el estado del compartimiento de células T “naive” en relación con su origen tímico. Los desórdenes por inmunodeficiencia primaria se caracterizan por una disminución o

ausencia, y ambos, del rendimiento del timo; y a menudo involucra la disminución de linfocitos T CD45RA+.

Evidencias científicas sugieren el importante papel de la subpoblación T "naive" en el origen y el mantenimiento de efectores autorreactivos en la periferia. (5)

Las células T reguladoras son capaces de controlar células T autorreactivas efectivamente, en especial cuando la selección negativa tímica es defectuosa. Su diferenciación y función está controlada por Foxp3. La disminución o ausencia de las células T reguladoras conlleva a enfermedades autoinmunes, específicamente aquellas mediadas por células T CD4+, y a la linfoproliferación caracterizada por inflitrados multiórganos y otros desórdenes autoinmunes.[4, 5]

OBJETIVO

General: Establecer el diagnóstico de un paciente en edad pediátrica con sospecha de inmunodeficiencia primaria por desregulación, un Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (ALPS).

Específicos:

1. Evaluar la población DNT TCRαβ+, relevante en el diagnóstico de ALPS.
2. Cuantificar poblaciones celulares que exhiban marcadores de activación, diferenciación y regulación de las células T relevantes en el estudio de esta enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron los anticuerpos monoclonales (AcMo) α CD4FITC/CD8PE/CD3PC5 triple marcado (Beckman Coulter), TCRαβAPC, CD4PE, CD45RAPerCP, CD45ROFITC, CD8FITC, CD45ROPE, CD4APC, CD25F, CD56PE, CD19PerCP, CD3PE, CD5PE, CD45PerCP, CD4FITC, CD38FITC, HLA DR y el Kit de células T reguladoras CD4FITC/CD25PE/Foxp3APC, todos ellos de Miltenyi Biotec.

El ensayo incluyó el uso de un control sano. Ambas muestras fueron procesadas al unísono para garantizar reproducibilidad. Las muestras se adquirieron 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, para la cuantificación de DNT TCRαβ+ y de las células T reguladoras.

RESULTADOS

El paciente estudiado mostró 11,60 % de células T doble negativas TCRαβ+, en relación con un 1,45 % del control sano. La presencia de esta población de células T en pacientes diagnosticados con SEF, aún en ausencia de linfoproliferación, es consistente con ALPS.[5]

La población DNT TCRαβ$^+$ aumentada y la linfoproliferación -expresada como linfoadenopatías y esplenomegalia de causa no infecciosa ni maligna-, de al menos 6 meses de evolución; más los hallazgos inmunohistológicos típicos encontrados en la biopsia de ganglio del paciente (hiperplasia paracortical), la presencia de citopenias autoinmunes (anemia hemolítica y trombocitopenia) e hipergammaglubulinemia, conllevaron al "diagnóstico probable" de ALPS en el paciente estudiado.

La acumulación de las DNT en los linfonodos y otros órganos periféricos es acompañada de cambios cualitativos en la composición del repertorio de células T, de tal modo, el inmunofenotipo realizado contempló marcadores de activación, diferenciación y regulación.

La evaluación de la activación sobre linfocitos T y células NK arrojó que existía una ligera disminución de la expresión del receptor para IL-2, CD 25.

La población CD19+CD25+ se expresó en mayor por ciento -aunque discretamente- en el paciente que en el control sano, lo que se relacionó directamente con la presencia de hipergammaglobulinemia, IgA elevada y presencia de autoanticuerpos; resaltado además por la elevada expresión de la población autorreactiva CD19+CD5+ en el paciente estudiado (11,73 % vs 0,39 %).

Para conocer el impacto sobre la diferenciación celular se evaluaron las subpoblaciones de células efectoras y de memoria para linfocitos T CD4+ y CD8+, mediante la combinación de las isoformas CD45RA y CD45RO.

CD45RA se expresa en linfocitos T vírgenes. Particularmente la población CD4+CD45RA+ tiene una función esencial como inductora de supresión, y se encuentra disminuida en el paciente estudiado, en relación al control. (29,11 % vs 62,75 %, respectivamente) Igual comportamiento mostraron las células de memoria y efectoras CD4+CD45RO+, 53,38 % vs 73,37 %.

En la propia población CD4+, se pudo constatar la presencia de un clon que expresó ambos receptores (CD45RA y CD45RO), probablemente una población TEMRA (*terminally*

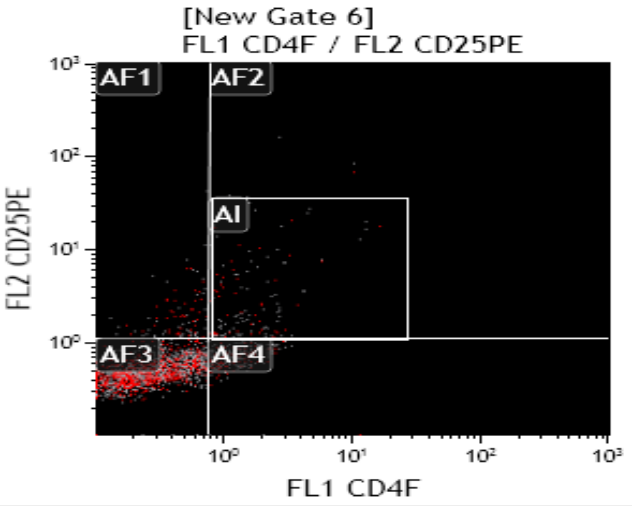
differentiated effector memory cells). Al comparar los resultados, inesperadamente se encontró que había una ligera disminución entre paciente y control (2,70 % vs 4,0 %).

Como el fenotipo característico de la población celular TEMRA no se pudo corroborar no se hicieron valoraciones concluyentes.

La combinación de las isoformas de CD45 también se usó para estudiar los linfocitos T CD8+, pero se observó un comportamiento similar entre paciente y control sano.

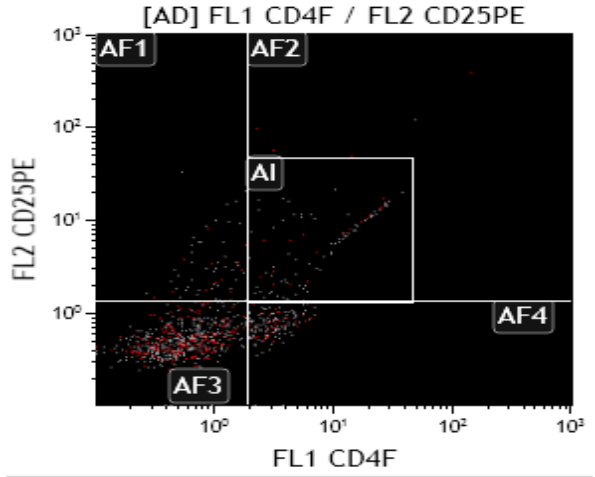
El análisis de la regulación de la respuesta inmune permitió constatar una disminución de la población CD4+CD25+ y de la expresión del factor de transcripción Foxp3, en el paciente respecto al control. (figura)

PACIENTE (HAR)

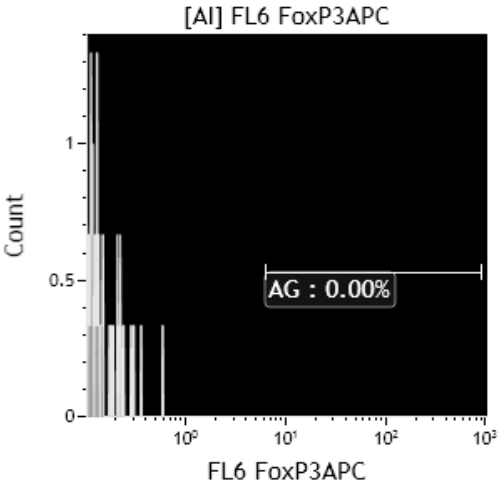


Gate	%Gated
All	100.00
AF1	4.51
AF2	6.40
AF3	75.27
AF4	13.82
AI	6.30

CONTROL



Gate	%Gated
All	100.00
AF1	7.17
AF2	11.63
AF3	63.92
AF4	17.27
AI	11.16



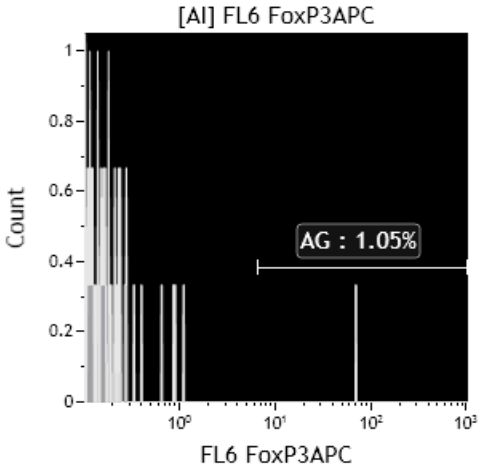


Figura: Estrategia de análisis de células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+ por citometría de flujo.

CONCLUSIONES

1. La cuantificación marcadamente elevada de linfocitos T CD4-CD8-TCRαβ+ define el "diagnóstico probable" de Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune en el paciente objeto de estudio.
2. Se constata la activación aumentada de las células CD19+ y la presencia de la población autorreactiva CD19+CD5+, responsable en gran medida de la autoinmunidad y la linfoproliferación en el ALPS.
3. La disminución de la población inductora de supresión T CD4+CD45RA+ evidenciada permite corroborar su implicación en este desorden por inmunodeficiencia primaria, en relación a la disfunción del timo que origina y mantiene efectores autorreactivos en la periferia. 4) La disminución de la expresión del factor de transcripción Foxp3 observada, señala hacia una baja regulación de la respuesta que conlleva a la autoinmunidad y a la linfoproliferación, específicamente mediada por células T $CD4^{+}$.

RECOMENDACIONES

1. Ampliar el inmunofenotipo por citometría de flujo a la evaluación de células DNT TCRαβ+, de modo que se puedan dilucidar aspectos relativos a su activación y diferenciación.
2. Incorporar el estudio de las mutaciones FAS y sus productos génicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rao VK. Approaches to managing autoinmune cytopenias in novel immunological disorders with genetic underpinnings like autoimmune limphoproliferative syndrome. Front Pediatr. 2015; 3:65. DOI: 10.3389/fped.2015.00065
2. Rensing-Ehl A, Volkl S, Speckmann C, Lorenz MR, Ritter J, Janda A, Abinum A et al. Abnormally differentiated CD4+ or CD8+ cells with phenotypic and genetic features of double negative T cells in human Fas deficiency. Blood 2014; 124(6):851-60.

3. Rieux-Laucat F. Comment on Rensing-Ehl et al Live and let die at TEMRA. Blood 2014;124(6): 828-30 DOI: 10.1182/blood-2014-06-581637
4. Li P, Huang P, Yang Y, Hao M, Peng H, Li F. Updated understanding of autoinmune limphoproliferative syndrome (ALPS). Clinic Rev Allerg Immunol 2016; 50: 55-63 DOI: 10.1007/s12016-015-8466-y
5. Feng Y, van der Veeken J, Shugay M, Putintseva EV, Osmanbeyoglu HU, Dikity S, Hoyos BE et al. A mechanism for expansion of regulatory T-cell repertoire and its role in self-tolerance. Nature 2015; 528: 132-6. DOI: 10.1038/nature16141.