

# Incremento de linfocitos T gamma-delta en sangre periférica de pacientes afectados de fibrosis quística

J. Pérez-Payarols, M.R. Juliá Benique<sup>1</sup>, N. Matamoros Florí<sup>1</sup>, J.M. Román Piñana

**Resumen. Fundamento.** La función de las células T  $\gamma$ - $\delta$  del sistema inmune del hombre no es bien conocida en la actualidad. Sólo el 3-10% de las células T expresan el heterodímero compuesto por las cadenas  $\gamma$  y  $\delta$ . Estudios recientes han demostrado un papel de las células T  $\gamma$ - $\delta$  en la inmunopatogénesis de las enfermedades autoinmunes e infecciosas.

**Material y método.** El presente estudio fue diseñado para evaluar los valores de células T  $\gamma$ - $\delta$  en pacientes con fibrosis quística colonizados por *P. aeruginosa*. Como grupos comparativos se utilizaron los niveles sanguíneos de células T de pacientes con infecciones pulmonares agudas, infecciones pulmonares crónicas y niños controles sanos. El fenotipo celular fue determinado por citometría de flujo. Se utilizaron anticuerpos monoclonales frente a los diferentes tipos celulares estudiados. Las medidas fueron comparadas mediante test de Student o Mann Whitney.

**Resultados.** Se evidencia que el porcentaje de células T  $\gamma$ - $\delta$  (TCR 1+) está significativamente aumentado en los pacientes afectados de fibrosis quística versus controles patológicos y niños sanos.

**Conclusión.** Los resultados muestran que los niños con fibrosis quística infectados con *Pseudomonas aeruginosa* muestran un incremento de las subclases de células T con receptor  $\gamma$ - $\delta$ .

*An Esp Pediatr* 1996;44:239-241.

**Palabras clave:** Fibrosis quística; *Pseudomonas aeruginosa*.

## INCREASE IN PERIPHERAL BLOOD OF GAMMA-DELTA T CELLS IN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS

**Abstract.** The function of the T $\gamma$ - $\delta$  cells of the human immune system is not well known at present. Only 3-10% of the T cells express the heterodimer composed of the  $\gamma$ - $\delta$  chains. Recent studies have demonstrated a role of the T  $\gamma$ - $\delta$  cells in the immunopathogenesis of autoimmune and infectious diseases. The present study was designed to evaluate the quantity of T  $\gamma$ - $\delta$  cells in patients with cystic fibrosis with *P. aeruginosa* infections. These results were compared to blood levels of T cells found in patients with acute pulmonary infections, chronic pulmonary infections and healthy control patients. The cellular phenotype was determined by flow cytometry. Monoclonal antibodies against the different cell types studied were employed. The means of each group were compared by a Student's T test of Mann Whitney. We found that the percentage of T  $\gamma$ - $\delta$  cells (TCR 1+) was significantly increased in patients with cystic fibrosis when compared to the pathological controls and healthy children. We conclude that our results demonstrate that children with cystic fibrosis infected with *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate an increase in the subclass of T cells with the  $\gamma$ - $\delta$  receptor.

**Key words:** Cystic fibrosis;  $\gamma$ - $\delta$  T cells.

Unidad de Oncología Pediátrica e <sup>1</sup>Inmunología. Hospital «Son Dureta». Palma de Mallorca.

Correspondencia: Dr. J. Pérez-Payarols

Calle de la Falguera, 41 B. 07014 Palma de Mallorca (Balears).

Recibido: Septiembre 1994

Aceptado: Marzo 1995

La fibrosis quística (FQ), enfermedad multisistémica de niños y adultos jóvenes, es el trastorno congénito más común en la raza blanca<sup>(1)</sup>.

A pesar de los avances en el tratamiento, las infecciones broncopulmonares siguen siendo las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad en los pacientes afectados de FQ<sup>(2)</sup>. Se ha sugerido que anomalías de base en el sistema inmune podrían ser responsables de las repetidas infecciones y del daño pulmonar de estos pacientes<sup>(3)</sup>. El estado de la inmunidad humoral y celular en la FQ sigue en la actualidad controvertido.

La mayoría de linfocitos T de sangre periférica muestran el tipo  $\alpha$ - $\beta$  del receptor de célula T ( $\alpha$ - $\beta$ -TCR), pero una minoría de células T expresan un receptor con cadenas  $\gamma$ - $\delta$ <sup>(4)</sup>. Esta pequeña población de células T está presente en sangre periférica y en diferentes tejidos linfoides sin ser mayoritaria en ningún órgano específico en el hombre<sup>(5)</sup>.

Las funciones efectoras atribuidas a los linfocitos T  $\gamma$ - $\delta$  incluyen actividad citotóxica, secreción de múltiples citoquinas y actividad «helper» para la producción de inmunoglobulinas<sup>(6)</sup>. No ha sido descrita una única actividad funcional de las células T  $\gamma$ - $\delta$ . La mayoría de estas células reconoce antígenos, independientemente de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) o en asociación con moléculas no clásicamente ligadas a los CMH<sup>(7)</sup>. Las células  $\gamma$ - $\delta$  proliferan frente a algunos microorganismos, como *Mycobacteria tuberculosis*, y han sido relacionadas con fenómenos autoinmunes debido a su activación por las «heat-shock proteins»<sup>(8)</sup>, moléculas estas últimas implicadas en mecanismos de mimetismo molecular entre agentes infecciosos y huésped.

## Material

Se estudiaron muestras de sangre periférica de 10 pacientes afectados de FQ (8 mujeres y 2 varones), con edades comprendidas entre los 18 meses y los 14 años (media de 7 años). La FQ se diagnosticó en base a signos y síntomas clínicos y al aumento de electrolitos en el test de sudor. La severidad clínica de la enfermedad fue estimada usando la clasificación de Shwachman<sup>(9)</sup>. Todos los pacientes incluidos en el estudio tenían una enfermedad pulmonar moderada o severa y sus pulmones estaban crónicamente colonizados por *Pseudomonas aeruginosa* (PA) mucóide durante el tiempo del estudio.

El grupo control patológico consistió en cuatro pacientes con infección pulmonar aguda y 6 con infección bacteriana pulmo-

Tabla I Subclases de linfocitos T en FQ (A), controles normales (B) y controles patológicos (C)

	FQ (A)	Control (B)	Control (C)
CD3	68 ± 7,5	63 ± 7	61 ± 6,5
CD4	37 ± 4,5	35 ± 6,5	34,5 ± 1
CD8	29 ± 5	31 ± 4	25 ± 5,5
TCR- $\delta$ -1*	13 ± 3,5	6,8 ± 3,2	4,24 ± 2
$\delta$ -TCS1	2,1 ± 1,9	1,8 ± 0,9	1,13 ± 0,8
TCR- $\delta$ -1/CD45RO+**	48 ± 14	24 ± 13	18 ± 11
$\delta$ -TCS1/CD45RO+	4 ± 4	4,4 ± 3	4,8 ± 7

\*  $p < 0,0005$  (A, B);  $p < 0,00001$  (A, C). \*\*  $p < 0,01$  (A, B);  $p < 0,005$  (A, C). Resultados expresados como media  $\pm$  ISD

nar crónica (4 ventilación asistida, 1 déficit de IgG2 y 1 síndrome de cilios inmóviles), tres con infecciones por PA recurrentes. Un grupo control normal estuvo formado por 15 niños sanos con igual distribución de edad y sexo que el grupo patológico.

El consentimiento de los padres fue obtenido en todos los pacientes.

## Método

El fenotipo celular fue determinado por citometría de flujo (FACScan Cytometer. Research software 2.1 version. Becton Dickinson). Se efectuó inmunofluorescencia de dos o tres colores y se analizaron unos 10.000 eventos. Los anticuerpos monoclonales usados fueron: anti-CD3, marcador de toda la población linfocitaria T, conjugado con fluoresceína (Becton Dickinson). Anti-CD4, marcador de la población T «cooperadora», conjugado con fluoresceína (Becton Dickinson). Anti-CD8, marcador de la población T supresora/citotóxica, conjugado con PerCP (Becton Dickinson). Anti-TCR- $\delta$ -1, marcador de toda la población T con receptor  $\gamma/\delta$ , conjugado con fluoresceína (T Cell Science). Anti- $\delta$ -TCS-1, marcador de la subpoblación de células T  $\gamma/\delta$  positivas que reordenan las regiones V- $\delta$ -1 y J- $\delta$ -1, conjugado con fluoresceína (T Cell Science). Anti-CD45RO, marcador de células T «memoria», conjugado con fluoresceína (Becton Dickinson).

Se obtuvieron tres muestras de cada paciente afecto de FQ en un período mínimo de 3 meses. Los resultados se expresan como la media del porcentaje de células positivas respecto al total de linfocitos, éstos fueron seleccionados «in vivo» mediante una «ventana» utilizando los parámetros morfológicos de granulosidad y tamaño celular. La expresión CD45RO es referida como el porcentaje de células TCR- $\delta$ -1 positivas que también presentan altos niveles de CD45RO.

Las medidas fueron comparadas mediante el test de Student o Mann Whitney, para muestras pequeñas.

## Resultados

No se encuentran diferencias entre los valores de CD3 totales y las subpoblaciones T CD4 y CD8 entre los pacientes afectados de FQ y los grupos control. El porcentaje total de células T  $\gamma$ - $\delta$  (TCR- $\delta$ -1+) está significativamente aumentado en los pacientes afectados de FQ (13  $\pm$  3,5) vs sanos y controles patológicos.

La subpoblación de células T  $\gamma$ - $\delta$  con presencia de V- $\delta$ -1/J- $\delta$ -1 ( $\delta$ -TCS1+) está en la misma proporción en pacientes FQ (2,1  $\pm$  1,9) y controles (tabla I). En el recuento total de linfocitos no hay diferencia entre los tres grupos. En cualquier caso, tampoco existe variación significativa entre los tres valores obtenidos para cada paciente.

La alta expresión de la isoforma CD45RO, marcador putativo para células T de memoria, en el total de células T  $\gamma$ - $\delta$  está también significativamente aumentada en los pacientes FQ (47,7  $\pm$  14) comparada con los controles (tabla I). Una minoría de células  $\delta$ -TCS1+ expresan este antígeno tanto en pacientes FQ (4,1  $\pm$  3,3) como en controles.

Entre los dos grupos control no hay diferencias significativas en cualquiera de los parámetros estudiados.

## Discusión

Este estudio demuestra un aumento significativo de los linfocitos T  $\gamma$ - $\delta$  en sangre periférica de los pacientes afectados de fibrosis quística con moderada o severa enfermedad pulmonar.

La infección pulmonar crónica en pacientes con FQ, frecuentemente relacionada a infección por PA, ha sido asociada con progresiva destrucción pulmonar y mal pronóstico<sup>(9)</sup>. El daño del parénquima pulmonar puede ser secundario a la acción directa de los productos nocivos producidos por las mismas bacterias, especialmente PA, por la respuesta inmune activada inducida por la infección crónica o por ambas<sup>(10)</sup>. Es bien conocido que la respuesta inflamatoria excesiva, inefectiva para eliminar los microorganismos endobronquiales, tiene un papel en la patogénesis y progresión de la disfunción pulmonar en la FQ<sup>(11)</sup>. Esta respuesta inflamatoria puede convertirse en crónica y finalmente conducir al daño del tejido huésped que actúa como mero espectador.

Las células T  $\gamma$ - $\delta$  pueden jugar un papel protegiendo al pulmón de la invasión bacteriana intracelular o eliminando células alteradas. Por otro lado, las células T  $\gamma$ - $\delta$  pueden inducir citotoxicidad y mediar en la destrucción del epitelio respiratorio.

El selectivo incremento de las células T  $\gamma$ - $\delta$  relacionadas con la función memoria, fenotípicamente identificadas en nuestros pacientes como  $\delta$ -TCS1-/CD45RO+, apoya la idea de un estímulo antigénico local, que pudiera inducir una respuesta mediada por estas células. Esta subpoblación ha sido relacionada con la adquisición de memoria en las células T  $\gamma$ - $\delta$  y con su reactividad frente a diferentes antígenos y mitógenos<sup>(13-15)</sup>. Las células T  $\delta$ -TCS1-/CD45RO+ podrían relacionarse también con la hipergammaglobulinemia observada en pacientes de FQ con mal pronóstico.

En conclusión, el presente estudio sugiere una relación entre el incremento de linfocitos T  $\gamma$ - $\delta$  en sangre periférica y la se-

veridad de la enfermedad pulmonar en pacientes afectados de FQ. Es preciso un seguimiento a más largo plazo de los pacientes estudiados, así como un estudio más amplio para determinar el papel exacto de las células T  $\gamma$ - $\delta$  en la fibrosis quística y su utilización como marcador de la evolución de la enfermedad.

## Bibliografía

- 1 Di Sant'Agnes PA, David PB. Research in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1976;**481**:481-485.
- 2 Smith MJ, Morris L, Stead RJ, Hodson ME, Batten JC. Lymphocyte subpopulations and function in cystic fibrosis. *Eur J Res Dis* 1987;**70**:300-308.
- 3 Lahat N, Rivlin J, Iancu T. Functional immunoregulatory T-Cell abnormalities in cystic fibrosis patients. *J Clin Immunol* 1989;**9**:287-294.
- 4 Ito M, Kojiro N, Ikeda T y cols. Increased proportions of peripheral blood  $\gamma$ - $\delta$  T cells in patients with pulmonary tuberculosis. *Chest* 1992;**102**:195-197.
- 5 Falani B, Flenghi L, Pileri S y cols. Distribution of T cells bearing different forms of the T cell receptor  $\gamma$ - $\delta$  in normal and pathological human tissues. *J Immunol* 1989;**143**:2480-2488.
- 6 Porcelli S, Brenner M, Band H. Biology of the human  $\gamma$ - $\delta$  T-cell receptor. *Immunol Rev* 1992;**120**:137-175.
- 7 Groh V, Porcelli S, Fabbi M y cols. Human lymphocytes bearing T cell receptor  $\gamma$ - $\delta$  are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphod system. *J Exp Med* 1989;**169**:1277-1294.
- 8 Zutter M,  $\gamma$ - $\delta$  T-cells in the immune response. *Am J Clin Pathol* 1991;**95**:761-762.
- 9 Shwachman H, Kulczycki LL. Long-term study of one hundred five patients with cystic fibrosis. *Am J Dis Child* 1058;**96**:6.
- 10 Valerius N, Koch Ch, Hoiby N. Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet* 1991;**338**:725.
- 11 Gilligan P. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 1991;**4**:35-51.
- 12 Auerbach H, Williams M, Kirkpatrick J, Colten H. Alternate-day prednisone reduces morbidity and improves pulmonary function in cystic fibrosis. *Lancet* 1985;**ii**:686-688.
- 13 Miyawaki T, Kasahara Y, Taga K y cols. Differential expression of CD45RO and its functional relevance in two subpopulations of circulating TCR- $\gamma$ - $\delta$  lymphocytes. *J Exp Med* 1990;**171**:1833-1838.
- 14 Langhorne J, Goodier M, Behr Ch y cols. Is there a role for  $\gamma$ - $\delta$  T-Cells in malaria?. *Immunol Today* 1992;**13**:298-300.