

INSTITUTO DE HEMATOLOGIA E INMUNOLOGIA

Estudio de las poblaciones linfoides en niños con anemia drepanocítica

Por:

PORFIRIO HERNANDEZ RAMIREZ*, CARLOS CRUZ SOTOLONGO**, MARIA NILA SANTOS LAGRESA***, ALEJANDRO GONZALEZ OTERO**** y EVA G. SVARCH*****

Hernández, R. P. y otros. *Estudio de las poblaciones linfoides en niños con anemia drepanocítica*. Rev Cub Ped 56: 1, 1984.

Se hizo un estudio inmunológico de 22 niños con anemia drepanocítica, comprendidos entre los 3 y 14 años de edad. Se encontró un aumento significativo del recuento total de leucocitos con una linfocitosis absoluta ligera. La población total de linfocitos T era normal, mientras que el porcentaje de linfocitos T activos se observó disminuido. Los linfocitos formadores de rosetas con eritrocitos recubiertos con anticuerpos y complemento (rosetas EAC) estaban aumentados. Los linfocitos con receptores para la fracción Fc de la IgG dieron valores normales, aunque ligeramente superiores a los del grupo control. La cuantificación de la incorporación a los linfocitos de timidina tritiada fue normal. Se apreció anergia cutánea sólo en el 10% de los casos.

Es un hecho bien establecido que los enfermos con anemia drepanocítica (AD) tienen una gran tendencia a presentar infecciones frecuentes. La naturaleza exacta del defecto inmunológico que es responsable de esta predisposición a los procesos infecciosos, no se conoce. Entre los factores que pueden contribuir a ese estado se encuentran los siguientes: la sobrecarga del sistema reticuloendotelial con productos de la degradación de la hemoglobina y producción de una autoesplenectomía funcional, cinética anormal de los neutrófilos, disminución de la eficiencia del poder fa-

* Especialista de I grado en medicina interna. Jefe del departamento de biología celular. Subdirector de investigaciones. Instituto de Hematología e Inmunología.

** Licenciado en Biología. Investigador Auxiliar. Departamento de Inmunología. Instituto de Hematología e Inmunología.

*** Especialista de I grado en inmunología. Instituto de Hematología e Inmunología.

**** Especialista de I grado en Hematología. Departamento de clínica de niños. Instituto de Hematología e Inmunología.

***** Especialista de I grado en pediatría. Profesora Auxiliar. Investigadora Titular. Jefa del servicio de pediatría del Instituto de Hematología e Inmunología.

gocítico, bactericida, y de la quimiotaxia del leucocito polimorfonuclear, defecto de la vía alterna del complemento, deficiencia de la actividad bactericida y opsonificante del suero, aumento de la concentración del hierro sérico y disminución de los niveles de la transferrina.^{1,7}

En los últimos años se han hecho varios estudios en relación con el comportamiento de las poblaciones linfocitarias en la AD, lo que ha contribuido a un mejor conocimiento del estado de la inmunidad celular en estos enfermos.⁸⁻¹³

El objetivo de este trabajo consiste en informar los resultados de la cuantificación de las poblaciones linfoides y de la evaluación de la capacidad funcional de los linfocitos T efectuadas en un grupo de niños con AD.

MATERIAL Y METODO

Se estudiaron 22 niños con AD (12 varones y 10 hembras) atendidos en el Instituto de Hematología e Inmunología. La edad promedio era de 10,5 años con un rango de 3 a 14 años. En el momento del examen, todos los enfermos se encontraban asintomáticos y ninguno había presentado algún tipo de complicación de la enfermedad ni recibido transfusiones por lo menos durante un período de 30 días antes de la investigación.

Las células mononucleadas se obtuvieron de sangre venosa heparinizada, mediante un gradiente de Ficoll-Telebrix (Laboratorios André Guebert, Francia).¹⁴ En todos los casos, la viabilidad celular fue mayor del 95% de acuerdo con la técnica de la exclusión del azul tripano. Las células fagocíticas se distinguieron por el método de observación de las células a través de un cubreobjeto coloreado con naranja de acridina.

La cuantificación de los linfocitos formadores de rosetas espontáneas (RE), linfocitos T, se realizó según el procedimiento estandarizado en nuestro centro.¹⁵ La determinación de linfocitos formadores de rosetas espontáneas activas (RE_a) linfocitos T activos, se hizo de acuerdo con las indicaciones de Wybrand.¹⁶ La investigación de los receptores linfoides para las fracciones C3_b del complemento y Fc de la IgG se efectuó mediante las rosetas EAC¹⁵ y EA¹⁷ respectivamente. En todas pruebas se evaluó como célula formadora de roseta a aquella que se unía por lo menos a tres hematíes. En cada ocasión se contó un mínimo de 200 células.

Como grupo control de estas pruebas se utilizaron diez niños sanos con un rango de edad de 8 a 14 años.

El recuento de leucocitos y el diferencial se hicieron simultáneamente con el propósito de poder calcular los valores absolutos de las células formadoras de rosetas.

El estudio *in vitro* de la función linfocitaria T se practicó mediante la cuantificación de la respuesta de los linfocitos a la estimulación con fitohemaglutinina (PHA) (*Purified Phytohaemagglutinin, Wellcome HA 16*). La respuesta al mitógeno se midió por un método morfológico¹⁸ y también por la incorporación de timidina tritiada a los linfocitos, determinada mediante una microtécnica.¹⁹ Cada muestra se montó por duplicado con PHA y sin PHA. En la prueba morfológica, el resultado se expresó como el por-

centaje de linfocitos transformados bajo la acción del mitógeno en un cultivo de 72 horas. La cuantificación de la incorporación de la timidina a los linfocitos se expresó en un índice de estimulación derivado de la relación entre el recuento por minuto de las muestras con mitógeno y sin mitógeno.

Como grupo control de estas pruebas se utilizaron 15 niños sanos. En todos se hizo la determinación morfológica y en 13 se midió la incorporación de la timidina tritiada. El rango de edad de este grupo era similar al de los niños con AD.

La capacidad funcional *in vivo* de los linfocitos T se valoró en todos los casos mediante pruebas cutáneas con tuberculina (PPD, 2UT), tricofitina (1:10), candidina (1:10) y PHA (0,1 mg/0,1 ml) (*Purified Phytohemagglutinin. Wellcome*). Todos los antígenos se aplicaron intradérmicamente en un volumen de 0,1 ml, con una aguja de calibre 26. La lectura de cada reacción se hizo a las 48 horas. El nódulo provocado se midió en dos diámetros perpendiculares y el valor promedio de estas determinaciones se tomó como el resultado de la prueba. Se consideró una reacción positiva cuando el nódulo midió al menos 5 mm en el diámetro promedio, excepto en el caso de la PHA que se dio como positiva cuando el nódulo era mayor de 10 mm.¹¹ Los pacientes que no respondieron a ninguno de los cuatro antígenos usados, se consideraron anérgicos.

Para el análisis estadístico se usó la prueba de la t de Student.

RESULTADOS

En el cuadro se muestran los valores promedios de la mayor parte de las pruebas realizadas. El número total de leucocitos se encontró significativamente aumentado ($P < 0,001$) en los pacientes comparados con los niños sanos.

Aunque no se observaron diferencias entre ambos grupos en el porcentaje promedio de linfocitos, se apreció un aumento moderado de estas células cuando se expresaron en valores absolutos ($P < 0,05$).

No se encontraron diferencias importantes entre los pacientes y los controles en lo referente al porcentaje promedio y al número absoluto de linfocitos T (rosetas E). Sin embargo, el porcentaje de células T activas (rosetas Ea) sí estaba disminuido significativamente ($P < 0,05$). La cifra absoluta era normal.

El valor promedio de rosetas EAC se halló aumentado en los niños con AD, tanto en cantidad relativa como absoluta ($P < 0,01$).

El porcentaje y el número absoluto de rosetas EA fueron ligeramente superiores en los enfermos con AD, pero esto no alcanzó significación estadística.

En los niños con AD, la apreciación morfológica de la transformación blástica inducida por la PHA ofreció un porcentaje promedio disminuido ($P < 0,01$). Sin embargo, la respuesta *in vitro* a la estimulación por este

CUADRO

PRUEBAS INMUNOLOGICAS REALIZADAS EN NIÑOS CON ANEMIA DREPANOCITICA

Determinación	Controles		Pacientes		P
	\bar{x}	\pm DE	\bar{x}	\pm DE	
Leucocitos x mm ³	7 170	\pm 1 365 (10)	10 200	\pm 2 420 (22)	< 0,001
Linfocitos-%	40,8	\pm 12,9	40,6	\pm 12,8	NS
x mm ³	2 910	\pm 1 026 (10)	4 234	\pm 1 936 (22)	< 0,05
Roseta E-%	66,6	\pm 8,9	61,8	\pm 8,8	NS
x mm ³	1 939	\pm 726 (10)	2 640	\pm 1 415 (22)	NS
Roseta E activa-%	47,2	\pm 7,5	36,2	\pm 15,3	< 0,05
x mm ³	1 357	\pm 463 (10)	1 436	\pm 765 (21)	NS
Roseta EAC-%	15,6	\pm 4,9	28,9	\pm 11,7	< 0,01
x mm ³	447	\pm 199 (10)	1 199	\pm 675 (22)	< 0,01
Roseta EA-%	18,1	\pm 6,7	26,5	\pm 18,7	NS
x mm ³	524	\pm 262 (10)	1 177	\pm 1 053 (20)	NS
Estimulación con fitohemaglutinina:					
Transformación morfológica-%	41	\pm 3,6 (15)	32,8	\pm 7,9 (17)	< 0,01
Incorporación de timidina tritiada:					
Índice de estimulación	11,9	\pm 6,4 (13)	6,9	\pm 6,0 (13)	NS

NS: No significativa.

DE: Desviación estándar.

(): Número de casos.

mitógeno, no mostró diferencia entre los grupos evaluados cuando se determinó mediante la cuantificación de la incorporación de timidina tritiada a los linfocitos.

Las pruebas cutáneas demostraron un estado anérgico solamente en dos enfermos (10%).

DISCUSION

La leucocitosis es un hallazgo frecuente en la AD. Esta leucocitosis puede explicar la linfocitosis absoluta moderada observada en los pacientes.¹¹

Igual que en otros estudios, los linfocitos T totales se encontraron normales.^{10,11} Sin embargo, otros investigadores han hallado una disminución de esta población linfocitaria.^{9,8,13}

Los linfocitos T activos estaban disminuidos en su porcentaje, pero eran normales al ser expresados en una cifra absoluta. Se ha planteado que las rosetas activas representan a los linfocitos T funcionalmente activos y reflejan mejor la inmunocompetencia de los linfocitos T, que el porcentaje total de estas células.²⁰

Los linfocitos B pueden ser identificados mediante diferentes marcadores. Entre otros, tenemos las inmunoglobulinas de superficie, los receptores para la fracción C3 del complemento, y los receptores para la fracción Fc de la IgG.

En un estudio previo realizado en adultos con AD, obtuvimos cifras normales de linfocitos formadores de rosetas EAC. En el presente trabajo éstos se encontraron aumentados, mientras que los linfocitos con receptores para la fracción Fc de la IgG no mostraron diferencia con el grupo control, aunque sus valores promedios resultaron ligeramente superiores.

Los receptores Fc se observan también en algunas subpoblaciones de linfocitos T.²¹ En la AD se ha comunicado un aumento de células T supresoras que fueron evaluadas mediante la cuantificación de las células T con receptores para la fracción Fc de la IgG.⁹

En los enfermos con AD, la cuantificación de los linfocitos B por medio de la determinación de inmunoglobulinas de superficie ha dado resultados normales¹³ o aumentados.⁸

Igual que en nuestro estudio anterior, la evaluación *in vitro* de la capacidad funcional del linfocito T estuvo disminuida cuando se apreció morfológicamente. Sin embargo, la incorporación de la timidina tritiada fue normal. Esto último concuerda con la reactividad normal de los linfocitos T observada por otros investigadores con el empleo de técnicas similares.^{10,13} La discrepancia entre los resultados morfológicos y la incorporación de timidina se pudiera interpretar, si se tiene en cuenta que el método morfológico se considera menos sensible y reproducible que el que mide la incorporación de timidina.¹³

En una proporción importante de enfermos con AD se ha comunicado la existencia de una disminución de la reactividad a las pruebas cutáneas.¹⁰⁻¹² En el presente estudio confirmamos esta observación, aunque en un porcentaje menor de pacientes. La alteración de las pruebas cutáneas que coinciden con una respuesta funcional normal del linfocito T *in vitro*, pudiera explicarse por la existencia de subpoblaciones de células T con propiedades y funciones distintas capaces de afectarse independientemente.¹¹ Se ha señalado la posibilidad de que el trastorno de la quimiotaxia que existe en la AD, pueda contribuir a la anergia cutánea encontrada en esta enfermedad.¹³ La anergia también se ha tratado de correlacionar con un déficit de zinc.¹²

No obstante los aportes que se han hecho al mejor conocimiento del estado de la inmunidad celular en la AD, consideramos que este aspecto de la enfermedad continúa siendo un tema de gran interés que merece ser investigado profundamente, a lo cual pudiera contribuir el estudio de las subpoblaciones de linfocitos T mediante anticuerpos monoclonales, así como la ejecución de diferentes pruebas *in vitro*, que permitan evaluar más ampliamente la capacidad funcional de estos linfocitos.

SUMMARY

Hernández, R. P. et al. *Study of lymphoid populations in children with drepanocytic anemia*. Rev Cub Ped 56: 1, 1984.

An immunologic study of 22 children with drepanocytic anemia, whose age ranged from 3 to 13 years, was performed. A significant increase of total leukocytes with slight absolute lymphocytosis was found. Total T lymphocytes population was normal, while it was observed that percentage of active T lymphocytes was decreased. Lymphocytes rosettes formation with erythrocytes recovered with antibodies and complement (EAC rosettes) were increased. Values of receptor lymphocytes for Fc fraction of IgG were normal, although slightly higher than those of the control group. Quantification of tritiated thymidine incorporation to lymphocytes was normal. Only 10% of the cases showed cutaneous anergy.

RÉSUMÉ

Hernández, R. P. et al. *Etude des populations lymphoïdes chez des enfants porteurs d'anémie drépanocytaire*. Rev Cub Ped 56: 1, 1984.

Il est réalisé une étude immunologique sur 22 enfants porteurs d'anémie drépanocytaire, âgés entre 3 et 14 ans. Il a été constaté une augmentation significative de la numération totale de leucocytes avec une lymphocytose absolue légère. La population totale de lymphocytes T était normale, tandis que le pourcentage de lymphocytes T actifs était diminué. Les lymphocytes qui forment des rosettes avec des érythrocytes revêtus d'anticorps et de complément (rosettes EAC) étaient augmentés. Les lymphocytes avec des récepteurs pour la fraction Fc de l'IgG ont montré des valeurs normales, quoique légèrement supérieures à celles du groupe témoin. La quantification de l'incorporation de thymidine tritiée aux lymphocytes a été normale. L'anergie cutanée n'a été observée que dans 10% des cas.

BIBLIOGRAFIA

1. Barret-Connor, E.: Bacterial infection in sickle cell anemia. *Medicine* 50:97, 1971.

2. *Dimitrov, N.V.; F. R. Douwes; B. Bartolotta; S. Nochumson; M. A. Toth*: Metabolic activity of polymorphonuclear leukocytes in sickle cell anemia. *Acta Haematol* 47: 283, 1972.
3. *Hand, W. L.; N. L. King*: Deficiency of serum bactericidal activity against *Salmonella typhimurium* in sickle cell anaemia. *Clin Exp Immunol* 30:262, 1977.
4. *McDonald, C. R.; E. R. Eichner*: Concurrent primary pneumococemia, disseminated intravascular coagulation and sickle-cell anemia. *Sth Med J (Nashville)* 71:858 1978.
5. *Overturf, G. D.; D. Powars; L. F. Baraff*: Bacterial meningitis and septicemia in sickle-cell disease. *Am J Dis Child* 131:784, 1977.
6. *Schwartz, A. D.; H. A. Pearson*: Impaired antibody response to intravenous immunization in sickle-cell anemia. *Pediatr Res* 6: 145, 1972.
7. *Winkelstein, J. A.; R. H. Drachman*: Deficiency of pneumococcal serum opsonizing activity in sickle-cell disease. *N Engl J Med* 279:459, 1968.
8. *Glassman, A. B.; D. V. Deas; F. S. Berlinsky; C. E. Bennet*: Lymphocyte blast transformation and peripheral lymphocyte percentages in patients with sickle cell disease. *Ann Clin Lab Sci* 10:9, 1980.
9. *Ades, E. W.; A. Hinson; S. K. Morgan*: Immunological studies in sickle cell disease. I Analysis of circulating T-lymphocyte subpopulations. *Clin Immunol Immunopathol* 17:459, 1980.
10. *Ogunye, O. O.; C. G. Uy; J. N. Sheagren; W. Strober*: Cellular immune functions in sickle cell anemia. *Nigerian Med J* 9:33, 1979.
11. *Hernández, P.; C. Cruz; M. N. Santos; J. M. Ballester*: Immunologic dysfunction in sickle cell anaemia. *Acta Haematol* 63:156, 1980.
12. *Ballester, O. F.; A. S. Prasad*: Anergy, Zn deficiency and decreased nucleoside phosphorylase (NP) activity in patients with sickle cell anemia. *Blood* 58(suppl. 1): 56a 1981 (abstracts).
13. *Hendriks, J.; K. De Ceulaer; E. Williams; G. R. Serjeant*: Mononuclear cells in sickle cell disease: subpopulations and in-vitro response to mitogens (pendiente de publicación).
14. *Böyum, A.*: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand J Clin Lab Invest* 21 (suppl. 97): 77, 1968.
15. *Cruz, C.; N. L. Fernández; B. Bernal; P. Hernández; J. M. Ballester*: Técnicas de rosetas. Su aplicación en diferentes pacientes con alteraciones inmunológicas. *Rev Cub Ped* 20(4):379, 1981.
16. *Wybrand, J.; H. H. Fudenberg*: Thymus derived rosette-forming cells in various human disease states: cancer, lymphoma, bacterial and viral infection and other diseases. *J Clin Invest* 52:1026, 1973.
17. *Gutiérrez, F.; F. Garrido; C. Osorio*: Citotoxicidad dependiente de anticuerpos en seres humanos. Relación entre células linfoides con receptores Fc y ADCC. *Sangre* 24:135, 1979.
18. *Dionigi, R.; A. Zonta; F. Albertario; R. Galcazzi; G. Bellinzona*: Cyclic variation in the response of lymphocytes to phytohemagglutinin in healthy individuals. *Transplantation* 16:550, 1973.
19. *Oppenheim, J. J.; B. Schechter*: Lymphocyte transformation. En: N. R. Rose; H. Friedman: (Eds.). *Manual of Clinical Immunology*. 2nd. ed., American Society for Microbiology. Washington, D C 1980 Pp. 236-237.

20. *Kotlout E.; W. Dutz: Analysis of lymphocyte receptors (B and T cells). En: M. Stefanini; A. A. Hossaini; H. D. Insenberg (Eds). Progress in clinical pathology. Vol. VII, Grune and Stratton, New York, 1978. P. 197.*
21. *Hernández, P.: El sistema inmune, evolución, estructura y funcionamiento. Acta Hematol Immunol 5: 3-51, 1981.*

Recibido: 11 de abril de 1983.

Aprobado: 2 de junio de 1983.

Dr. Porfirio Hernández Ramírez
Instituto de Hematología e Inmunología.
Calzada de Aldabó y Calle E,
Altahabana, Ciudad de La Habana 8.
Apartado Postal 8070.