

INSTITUTO DE HEMATOLOGIA E INMUNOLOGIA

Hemoglobinuria paroxística nocturna. Inmunología

Por:

PORFIRIO HERNANDEZ,¹² C. CRUZ,¹³ N. L. FERNANDEZ,^{**} R. LEON¹⁴ y JOSE MANUEL BALLESTER¹⁵

Hernández, P. y otros. *Hemoglobinuria paroxística nocturna. Inmunología.* Rev Cub Med 18: 5, 1979.

Se estudiaron 10 pacientes que padecían hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) con una edad comprendida entre 24 a 78 años (promedio 48 años). Solamente en un caso se encontró disminución del porcentaje de linfocitos T. En ningún paciente había disminución de las células con receptores para C3. La transformación blástica con fitohemaglutinina estaba disminuida en el 50% de los pacientes, y las pruebas cutáneas negativas en la mayoría de ellos. Se plantea trastorno de la función celular y se sugiere la hipótesis de que dicho trastorno es originado en una célula progenitora pluripotencial de naturaleza linfohematopoyética.

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es generalmente considerada una enfermedad poco frecuente. Sin embargo, en la actualidad se plantea que no es tan poco común como se había pensado inicialmente.¹

En varias ocasiones se ha informado la asociación de HPN con aplasia medular o procesos mieloproliferativos²⁻³ y aún se mantiene la interrogante sobre la inclusión de esta entidad en el conjunto de los síndromes mieloproliferativos.^{4,16}

En el momento actual se conoce perfectamente la existencia de dos tipos principales de linfocitos (B y T) que presentan grandes diferencias en sus propiedades biológicas. Mediante el estudio de las características de la membrana celular puede hacerse la identificación de estas poblaciones linfocitarias. La cuantificación de los linfocitos B puede realizarse mediante la demostración en la membrana linfocitaria de inmunoglobulinas de superficie;^{1'} antígenos celulares específicos⁷⁸ y de receptores para el tercer componente del complemento. Estos

12 Especialista. Departamento de clínica de adultos. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070. Ciudad de La Habana, 8. Cuba.

13 Licenciado en biología. Departamento de inmunología. Instituto de Hematología e Inmunología.

14 Especialista. Departamento de hematología. Hospital provincial "V. I. Lenin", Holguín.

15 Jefe del departamento de inmunología del Instituto de Hematología e Inmunología.

16 *Shcichi Nakawara.* A simple method for the determination of serum free insulin levels in insulin treated patients. Diabetes 22- 715- 720. 1973.

receptores se investigan mediante la formación de rosetas inmunes con hemáties recubiertos por anticuerpos y complemento (rosetas EAC).⁹

El linfocito T humano se cuantifica habitualmente por su capacidad selectiva de fijar glóbulos rojos de carnero con formación de rosetas espontáneas (rosetas E). En la práctica habitual junto con el recuento celular también se determina el estado funcional de los linfocitos.

El estudio del número y la capacidad funcional de los linfocitos B y T se ha realizado en diferentes enfermedades, entre las que se han incluido algunos síndromes mieloproliferativos.¹⁰⁻¹⁴

En este trabajo exponemos los resultados de la investigación inmunológica practicada en pacientes con HPN, que incluyó el recuento en sangre periférica de las células formadoras de rosetas E y EAC, los niveles de inmunoglobulinas séricas y el estado de la inmunidad mediada por células.

MATERIAL Y METODO

Se estudiaron 10 pacientes con HPN (3 hombres y 7 mujeres) atendidos en el Instituto de Hematología e Inmunología. La edad promedio era de 48 años con un rango que varió de 24 a 78 años. En cada caso las pruebas de la hemólisis ácida, sacarosa e insulina fueron positivas en varias ocasiones. En todos los enfermos se encontraban disminuidas la acetilcolinoesterasa eritrocitaria y la fosfatasa alcalina de los leucocitos.¹¹⁵

Los linfocitos se obtuvieron de sangre venosa heparinizada, mediante un gradiente de Ficoll-Telebrix (*Laboratoires Andre Guebert, France*).¹⁶ El examen morfológico de las células obtenidas mostró del 90% al 95% de células mononucleares con menos de un 5% de monocitos.

La cuantificación de las células formadoras de rosetas E y EAC se realizó por las técnicas de *Bach y Stjernswárd*, respectivamente.⁹¹⁷ En cada caso se contó un mínimo de 200

células mononucleadas, y se evaluó como célula formadora de roseta a aquella que se unía a tres o más eritrocitos. Con el propósito de identificar las características de estructura y forma de las células formadoras de rosetas, se realizaron extensiones celulares que se colorearon con May-Grünwald-Giemsa. Todas las pruebas se hicieron por duplicado.

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 E y EAC.

La transformación blástica del linfocito estimulada por la fitohemaglutinina (FHA), se expresó morfológicamente como el porcentaje de linfocitos transformados en un cultivo de 72 horas. Cada muestra se montó por duplicado con FHA (*Wellcome, HA 15*) y sin FHA.¹⁵

El recuento se realizó en extensiones celulares coloreadas con May-Grünwald-Giemsa.

La cuantificación de las inmunoglobulinas séricas se hizo por la técnica de inmunodifusión radial en placas comerciales (*Hyland División, Travenol Laboratories, Costa Mesa, California*).

La capacidad funcional de los linfocitos *in vivo* se valoró mediante pruebas cutáneas con PPD, tricofitina y candidina. La lectura se efectuó a las 48 horas y se consideró que la prueba era positiva cuando la reacción de induración fue por lo menos de 5 mm de diámetro.

Como grupos controles se tomaron 20 sujetos normales para los estudios celulares y 25 para la determinación de las inmunoglobulinas

RESULTADOS

En el cuadro se muestran los resultados de los estudios realizados. Solamente en tres pacientes se observó disminución de la cifra de leucocitos. Se encontró una linfocitosis moderada con valor promedio de 49% de linfocitos y

CUADRO
INMUNOLOGIA DE 10 PACIENTES CON HPN

Casos	Leucocitos $\times mm^3$	Linfocitos		Rosetas E		Rosetas EAC		Transformación blástica (FHA) %	Inmunoglobulinas mg/100 ml			Pruebas cutáneas		
		%	$\times mm^3$	%	$\times mm^3$	%	$\times mm^3$		%	IgG	IgA	IgM	PPD	Candida
1	3 900	46	1 794	57	1 023	29	520	30	1 200	450	140	0	0	0
2	6 300	36	2 268	69	1 565	21	476	50	1 250	300	520	3	0	0
3	4 000	69	2 760	71	1 960	21	580	44	1 200	130	425	0	0	0
4	5 000	64	3 200	76	2 432	33	1 056	32	3 400	230	80	0	0	0
5	4 300	39	1 677	71	1 191	21	352	50	780	66	100	0	0	0
6	6 300	62	3 906	76	2 969	34	1 328	52	1 350	550	1 200	0	0	NR
7	7 500	66	4 950	29	1 436	25	1 237	30	1 400	500	310	0	0	NR
8	13 500	36	4 860	71	3 450	32	1 555	48	800	350	58	0	5	NR
9	5 600	25	1 400	70	980	17	238	30	1 000	300	58	14	0	NR
10	7 200	49	3 528	75	2 646	18	635	26	1 200	380	105	15	10	NR
Controles														
Promedio	6 680	35	2 363	63	1 499	25	592	56	1 180	200	135	≥ 5	≥ 5	≥ 5
Rango	5 000-10 000	16-66	1 216-3 744	55-75	717-2 321	10-33	289-1 088	40-72	680-1 650	70-340	65-215			

NR = No realizado.

valores absolutos de 3 000 linfocitos/ mnr¹ comparados con las cifras de 35% y 2 400 linfocitos/mm³ obtenidas en el grupo control. Solamente en un paciente había disminución de los linfocitos T [células formadoras de rosetas E), pero los valores absolutos estaban dentro del rango de la normalidad. En el 40% de los enfermos se observó aumento de los valores absolutos de los linfocitos T. En tres pacientes (30%), estaba aumentado el número absoluto de las células formadoras de rosetas EAC.

La transformación blástica inducida por la FHA se encontró disminuida en el 50% de los pacientes. Solamente un paciente tenía disminución simultánea de las células formadoras de rosetas E y de la transformación blástica.

Las pruebas cutáneas dieron resultados negativos en el 70% de los enfermos.

La alteración más notable de las inmunoglobulinas fue el aumento de la IgA y la IgM en el 50% y el 40% de los pacientes, respectivamente.

COMENTARIOS

En la HPN se encuentra generalmente, aunque no de forma invariable, disminución de la cifra de leucocitos. La existencia de una linfocitosis relativa no es infrecuente.¹⁹

Se ha planteado que los linfocitos de la HPN son inmunológicamente competentes,²⁰ pero en realidad los estudios del estado de inmunidad de la HPN son muy pocos.^{1,21} Recientemente se ha encontrado disminución de la transformación blástica con FHA en 2 pacientes con HPN de tres casos estudiados.²

Nuestros resultados señalan que las células con receptores para C. (formadoras de rosetas EAC) y las inmunoglobulinas séricas, se encuentran generalmente normales o elevadas. También en la mayoría de los pacientes la cuantificación de los linfocitos T estaba normal o aumentada.

Los estudios funcionales del linfocito T realizados *in vitro* señalaron transformación blástica disminuida ante el estímulo de la FHA en un 50% de los enfermos; mientras que la hipersensibilidad retardada fue anormal en la mayoría de los pacientes, que se mostraron incapaces de responder a antígenos, tales como el PPD, la candidina o la tricofitina. Estas alteraciones en su conjunto plantean un defecto funcional de los linfocitos T.

En el ratón y la rata adulta, distintos estudios muestran la existencia de una célula progenitora (*Stem Cell*) pluripotencial, la cual es capaz de diferenciarse no sólo hacia las líneas mielóide, eritroide y megacariopoyética, sino también hacia la producción de linfocitos inmunocompetentes.²³

En general existe el concepto de que la HPN es el resultado de la emergencia en la médula ósea de un clono de células progenitoras anormales, probablemente como consecuencia de una mutación somática.²⁴

En la literatura médica se han informado distintos estados, tanto congénitos como adquiridos, donde hay simultáneamente una afectación de los sistemas hematopoyético y de inmunidad. En algunas ocasiones se ha señalado la posibilidad de un trastorno de la célula progenitora, como es el caso de la mielofibrosis.^{25,26} La existencia en las leucemias mieloides crónicas (LMC) de transformaciones linfoblásticas y el hallazgo del cromosoma Filadelfia en los linfocitos periféricos de algunas LMC, son otros elementos que apoyan el criterio acerca de la existencia de una célula progenitora pluripotencial con capacidades mielóide y linfóide.^{27,28}

Dameshek sugirió que la HPN podía estar vinculada a las leucemias y otros trastornos mieloproliferativos, posiblemente a través de un clono de células anormales que en unos casos era capaz de provocar un proceso mieloproliferativo, mientras que en otras ocasiones causaba una HPN.^{4,29}

Las alteraciones funcionales que hemos observado en los linfocitos de la HPN sugieren la hipótesis de un trastorno originado en una célula progenitora

pluripotencial de naturaleza linfohematopoyética. Por la importancia de esta hipótesis, es necesario confirmar estos hallazgos en un número mayor de pacientes.

SUMMARY

Hernández, P. et al. *Nocturnal paroxysmal hemoglobinuria. Immunology. Rev Cub Med* 18: 5, 1979.

Ten patients with nocturnal paroxysmal hemoglobinuria whose ages ranged between 24 and 78 years (mean 48 years) were studied. A decreased percentage of T lymphocytes was only found in a patient. A decrease of cells bearing C receptors was not evidenced in any patient. In 50% of patients, phytohemagglutinin-induced blast transformation was decreased; in most of them skin tests were negative. A cell function disorder as well as the suggestion that such disorder origins in a pluripotential blast cell with a lymphohematopoietic nature are pointed out.

RÉSUMÉ

Hernández, P. et al. *Hémoglobinurie paroxystique nocturne. Immunologie. Rev Cub Med* 18: 5, 1979.

Dix patients atteints d'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN), âgés entre 24 et 78 ans (moyenne 48 ans) ont été étudiés. On n'a trouvé diminution du pourcentage de lymphocytes T que chez un patient. Dans aucun cas il n'y avait diminution des cellules avec des récepteurs pour C3. La transformation blastique avec phytohémagglutinine était diminuée dans 50% des cas, et les tests cutanés étaient négatifs chez la plupart des patients. Les auteurs signalent l'existence d'un trouble de la fonction cellulaire et ils suggèrent l'hypothèse que ce trouble a son origine dans une cellule progénitrice pluripotente à nature lymphohématopoïétique.

PE3KME

3pHaHfle3, II. n jtp o Hernán napoKJacTírqécKaH reMorjiodHHVDZH.

Rev Cub Ked 18: 5, 1979»

Bujim: oócjie;n;oBaHH 10 naimeHTOB, fcoTopue CTpa,najin ho^ihoh napoK-cncTHHeCKoM reMorjiodimydJiea (HTET), naimeHTU óuuih b B03pacTe - ot 24 ,no 78 jieT (cpe,araid B03pacT 48 jieT). Tojibko y ojaxoro na- UKeHTa óhjo oóHapyEeHo noH@KeHHe nponeHTa jiiiM^auuTOB T. Hh b OfiHOM cjiy^ae He ótuo noHHxena mieTOK c peuTopoM Ha C3. Kirac TiraecKafl TpaHC\$opMaiiiai c \$HToreMaiviyTiiHOHOM óyjio noHuxeHHoi y 50% naimeHTOB, b H8raTSBHHe anajiH3H kokh y óojiBiiiKHCTBa M3 sthx namieHTOBo yKa3HBaeTCH HapymeHHe iweTO'iHoi \$yHKunn h BHUBHraeT ch rraoTe3a, 'íto sto KapymeKHe BU3BaHO nporeHKTophoii runopiino =- TeHUHajiBHoií KJieTKoMjiHM\$oreMaTonoúeK'TOTecKoúo

BIBLIOGRAFIA

1. *Dacie, J. V. The haemolytic anaemias. Con- 3. Lewis, S. M. et al. Myelosclerosis and pa- genital and acquired. Part IV. 2nd. Ed. P. roxysmal nocturnal hemoglobinuria. Scand 1128, J. & A. Churchill Ltd. London, 1967. j Haematol 5: 451-460, 1971.*
2. *Lewis, S. M.; J. V. Dacie. The aplastic anae- mia-paroxysmal nocturnal hemoglooinuria Dameshek. W. Forward and a proposal for syndrome. Br J Haematol 13: 236-251, 1967. considering paroxysmal nocturnal hemo- globinuria (PNH) as a "candidate" myelopro- liferative disorder. Blood 33: 263-264, 1969.*

5. *Hartmann, R. C.; A. B. Arnold.* Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) as a clonal disorder. *Ann Rev Med* 28: 187-194, 1977.
6. *Rabellino, E. et al.* Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. I. Distribution and quantitation. *J Exp Med* 133: 156-167, 1971.
7. *Billing, R. J. et al.* Human B lymphocyte antigens expressed by lymphocytic and myelocytic leukemia cells. 2. Detection by human anti B cell alloantisera. *J Natl Cancer Inst* 58: 199-203, 1977.
8. *Raff, M. C.* T and B lymphocytes in mice studied by using antisera against surface antigenic markers. *Am J Pathol* 65: 467-478, 1971.
9. *Stjernswärd, J. et al.* Lymphopenia and change in distribution of human B and T lymphocytes on peripheral blood induced by irradiation for mammary carcinoma. *Lancet* 1: 1352-1356, 1972.
10. *Belpomme, D. et al.* An immunological classification of leukemias and nonHodgkin's hematosarcomas based on T and B cell membrane markers with special reference to "nail" disorders. *Eur J Cancer* 13: 311-319, 1977.
11. *Glassman, A. B.; C. E. Bennett.* B and T lymphocytes. Methodology and normal ranges. *Ann Clin Lab Sci* 7: 519-523, 1977.
12. *Kaur, J. et al.* Increase of T lymphocytes in the spleen in chronic granulocytic leukemia. *Lancet* 1: 834-835, 1974.
13. *Leng, J. M. et al.* Autoimmunité et déficit de l'immunité cellulaire au cours des fibroses primitives de la moelle osseuse. *Ann Immunol (Inst. Pasteur)* 128: 291-293, 1977.
14. *Reddy, M. M.; K. O. Goh.* B and T lymphocytes in men. III. B, T and "nail" lymphocytes in multiple sclerosis. *Neurology* 26: 997-999, 1976.
15. *Dacie, J. V.; S. M. Lewis.* Practical haematology. Fifth Ed. p. 304. Churchill Livingstone, London. 1975.
16. *Bóyurn, 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 1 g. *Scand J Clin Lab Invest* 21 (Sup 97): 77-80, 1968.
17. *Bach, J. F.* Evaluation of T-cells and Thymic serum factors in man using the rosette technique. *Transplant Rev* 16: 196-217, 1973.
18. *Dionigi, R. et al.* Cyclic variation in the response of lymphocytes to Phytohemagglutinin in healthy individuals— Transplantation 16: 550-557, 1973.
19. *Wintrobe, M. M.* Hematología Clínica. 3ra. Ed., p. 499. Instituto Cubano del Libro. La Habana, 1972.
20. *Gluckman, E.* Hémoglobinurie nocturne paroxystique (Maladie de Marchiafava-Micheli). In: Dreyfus, B. Le Sang. p. 196. Flammarion Médecins Sciences. Paris, 1971.
21. *Dausset, J. et al.* Etude immunologique de neuf cas de syndrome de Marchiafava-Micheli. *Sem Hop Paris* 32: 366-371, 1956.
22. *Dibella, N. J.; G. L. Brown.* Immunologic dysfunction in the myeloproliferative disorders. *Cancer* 42: 149-158, 1978.
23. *Barr, R. D.; J. Watt.* Preliminary evidence for the common origin of a lympho-myeloid complex in man. *Acta Haematol* 60: 29-35, 1978.
24. *Whitehead, V. M.* Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, CMA. *Journal* 109: 961-962. 1973.
25. *Dao, C. et al.* Anomalies érythrocytaires et immunitaires. dans la splénomégalie myéloïde. *Nouv Rev Fr Hematol* 18: 619-626, 1977.
26. *Linsk, J. A. et al.* Myeloid, erythroid, and immune system defects in a family. A new stem-cell disorder? *Ann Intern Med* 82: 659-662, 1975.
27. *Nowell, P. C.; D. B. Wilson.* Lymphocytes and hemic Stem cells. *J Pathol* 65: 641-650, 1971.
28. *Rosenthal, S. et al.* Blast crisis of chronic granulocytic leukemia. Morphologic variants and therapeutic implications. *Am J Med* 63: 542-547, 1977.
29. *Dameshek, W.* What do aplastic anemia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and "hypoplastic" leukemia have in common? *Blood* 30: 251-254, 1967.