

## Sección: Artículos originales

## ***Linfocitos y monocitos anormales en la sangre periférica como factores predictivos de paraparesia espástica tropical asociada con el virus linfotrópico humano tipo I en Tumaco, Colombia.***

Francisco Falabella, M.D.<sup>1</sup>, María Teresa Rugeles, M.Sc.<sup>2</sup>, César Arango, M.D.<sup>3</sup>, Ernesto Bernal, M.D.<sup>4</sup>, Carlos Bernal, M.D.<sup>5</sup>

### RESUMEN

El virus linfotrópico humano tipo I (HTLV-I) produce la paraparesia espástica tropical (PET). En la literatura se describen algunos cambios morfológicos en los linfocitos de la sangre periférica en esta enfermedad. En el presente estudio se incluyeron 26 pacientes seropositivos para HTLV-I, y sintomáticos para PET, y 20 controles sanos del mismo origen en la ciudad de Tumaco, con el fin de buscar más información morfológica en la sangre periférica. Los resultados arrojaron información adicional, nueva por completo, confirmación de la ya conocida, además del alto valor predictivo positivo (VPP) y especificidad, no sólo de los cambios ya descritos en la literatura, sino los encontrados en este estudio. Es de gran interés también el valor predictivo negativo. Por último, al ajustar los VPP con la prevalencia de la PET en la población general para los hallazgos de linfocitos activados, monocitos activados o linfocitos multilobulados, éstos permanecieron en 100.0%, lo cual sugiere que la presencia de cualquiera de ellos en el extendido de sangre periférica, debe hacer pensar en PET-HTLV-I positiva y se debe confirmar.

La paraparesia espástica tropical (PET) es producida por el virus linfotrópico humano tipo I (HTLV-1). En los extendidos de sangre periférica, los linfocitos normales tienen tamaño y morfología variables. En tinciones hechas por el método de Wright el citoplasma es azul de diversa intensidad y el núcleo de color medianamente púrpura y no totalmente agregado en el linfocito más grande; en ocasiones tiene algunos gránulos rojos llamados azurófilos.

La cromatina es compacta y tiende a condensarse en la periferia. En el linfocito pequeño, su citoplasma es azul y escaso alrededor del núcleo de borde neto que suele tener escotaduras. Hay linfocitos intermedios<sup>1-4</sup>. En pacientes con PET y mielopatía asociada con el HTLV-I (HAM), se han descrito alteraciones morfológicas de los linfocitos periféricos consistentes en la aparición de núcleos polilobulados<sup>5,6</sup>.

El propósito de este estudio fue analizar los cambios morfológicos presentes en los linfocitos periféricos y otras células en enfermos con PET y evidencia serológica de infección por HTLV-I y compararlos con los encontrados en un grupo de controles seronegativos asintomáticos.

Se obtuvieron datos acerca de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de los diferentes hallazgos morfológicos, con el propósito de entregar una forma fácil y comprensiva a aquellos laboratorios que carecen de pruebas serológicas para identificar el HTLV-I y poder determinar en un momento dado, a través de análisis del extendido periférico, si un individuo con un síndrome neurológico compatible con PET, puede tener esta enfermedad.

1. Profesor Asociado, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Fundación Valle del Lili, Avda 1N 5 N 55, Cali, Colombia.
2. Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
3. Profesor Titular, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
4. Residente Departamento de Medicina Interna, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
5. Médico Rural, Patrulla Aérea del Pacífico, Cali, Colombia.

**MATERIAL Y METODOS**

**a. Población.** Desde 1986 en la ciudad de Tumaco, Nariño, Colombia, se han encontrado y seguido 45 pacientes con PET cuyo diagnóstico se ha hecho de acuerdo con criterios preestablecidos<sup>5</sup>. Los casos se aparearon con 45 controles asintomáticos. El apareamiento se hizo en proporción de uno a uno, con los siguientes criterios: igualdad de sexo; sitio de residencia en los últimos 5 años; similitud de raza; y edad, ( $\pm$  5 años como máxima diferencia). De esta población se seleccionaron 26 casos y 20 controles. La selección se basó en la aceptación del paciente para participar en esta parte del estudio.

**b. Laboratorio**

1. *Serología para el HTLV-I.* El proceso de filtro en los pacientes de Tumaco se hizo por 2 métodos de ELISA: el primero usó el virión completo desintegrado como antígeno (Dupont, Biotech), el segundo utilizó la proteína recombinante de la envoltura del virus gp21. Se usó además una prueba de radioinmunoensayo (Biotech, Rockville), que demuestra anticuerpos contra p24. Un resultado positivo por cualquiera de estas técnicas se confirmó por Western Blot con reactivos convencionales a los que se les adicionó la proteína recombinante de la envoltura p21e (Biotech, Rockville) con el propósito de aumentar la sensibilidad.

2. *Extendidos periféricos.* Se efectuaron extendidos de sangre periférica en portaobjetos que se remitieron para ser teñidos con la coloración de Wright. Dos de los autores estudiaron los extendidos al microscopio de luz en forma ciega, de tal manera que desconocían nombre y características patológicas o de normalidad sobre el origen de los extendidos. Los observadores hicieron la lectura a través de un microscopio Zeiss de doble cabeza binocular con el objetivo de menor aumento (10x) en una primera inspección; para buscar el área más adecuada se hizo la lectura con un objetivo planocromático de inmersión en aceite. Las fotomicrografías se tomaron con este microscopio y con cámara Pentax K 1000.

**c. Métodos estadísticos.** Cada característica de los cambios morfológicos se evaluó en la siguiente forma:

		PET (HTLV-I)	
		Presente	Ausente
Prueba o característica morfológica	Pos	a	b
	Neg	c	d

Sensibilidad:  $a/a+c$ . Especificidad:  $d/d+b$ . Tasa de falsos positivos:  $b/b+d$ ; tasa de falsos negativos:  $c/$

$a+c$ ; valor predictivo negativo:  $d/c+d$ .

Para aplicar los resultados a la población general de Tumaco, el valor predictivo se ajustó a la prevalencia de la enfermedad, de acuerdo con el teorema de Bayes, por la siguiente fórmula:

$$\text{VPP ajustado} = \frac{\text{Sen} \times \text{prevalencia}}{(\text{Sen} \times \text{prevalencia}) + [\text{FP} \times (1-\text{PREV})]}$$

Se calculó además la desigualdad relativa o razón de las desigualdades (OR), así como 95% de los intervalos o límites de confianza (IC o LC) y la probabilidad (p). Para ello se utilizó el programa EPISTAT.

**RESULTADOS**

**a. Población.** Hubo 26 casos y 20 controles. El promedio de edad de los individuos estudiados fue 49.8 años (mediana: 49 años, error estándar: 2.02 años). Fueron 22 hombres y 24 mujeres.

**b. Hallazgos morfológicos en los linfocitos**

1. *Vesiculaciones de membrana.* Se halló la presencia de una o más vesiculaciones de la membrana citoplasmática en forma redondeada y transparente. Estas vesiculaciones tienen tamaños variables y figura que oscila entre una formación de base ancha que se proyecta con un borde de punta redondeada más estrecha que la base o una elongación citoplasmática realmente vesiculada y transparente, con forma de esfera o media esfera unida a la célula por un estrecho tallo de implantación de la membrana. Las primeras semejan un pequeño pseudópodo, mientras que la segunda no. Se encontraron en linfocitos con o sin anomalías nucleares asociadas. En este último caso las alteraciones consistieron en pérdida del aspecto casi homogéneo de la cromatina y su reemplazo por bandas gruesas y ligera separación de éstas en ocasiones. De igual manera, aparecieron a veces alteraciones en la forma del núcleo consistentes en un desplazamiento a partir del borde nuclear de elongaciones nucleares de extremo romo usualmente, dando la impresión de "herniaciones" hacia algunas de las vesiculaciones mencionadas y a través del estrecho y corto tallo de implante (Figuras 1, 2, 3, y 6)

Las elongaciones de cromatina nuclear pueden ser múltiples y no siempre se encuentran en alguna vesícula; se dirigen hacia la periferia de la célula. El tamaño de estos linfocitos oscila entre 6 y 9  $\mu\text{m}$ ; su citoplasma es azul claro o intensamente basófilo y su relación núcleo/citoplasma muy estrecha (Figuras 4 y 5).

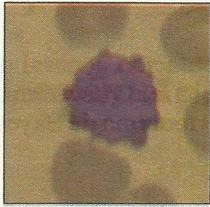


Figura 1

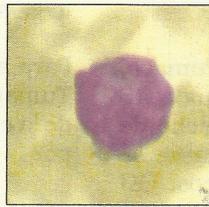


Figura 2

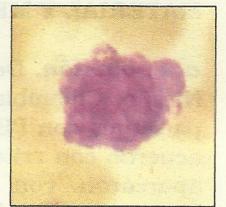


Figura 3

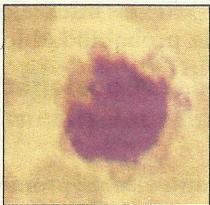


Figura 4

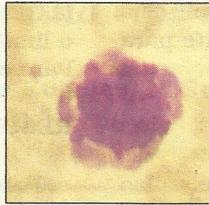


Figura 5

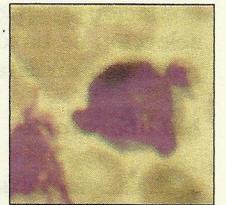


Figura 6

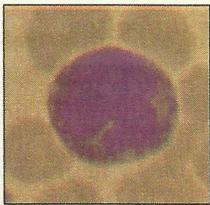


Figura 7

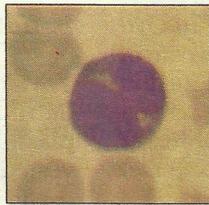


Figura 8

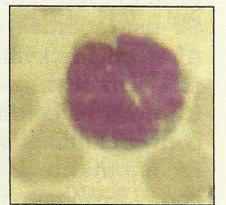


Figura 9

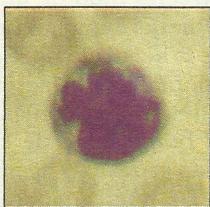


Figura 10

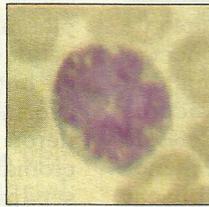


Figura 11



Figura 12

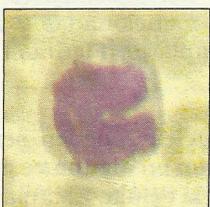


Figura 13

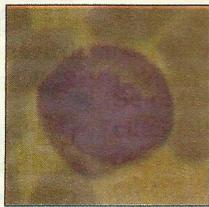


Figura 14

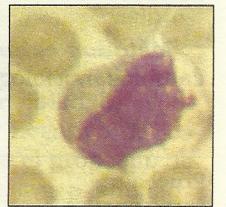


Figura 15

2. *Núcleo multilobulado.* Presente en linfocitos con tamaño entre 6 y 10  $\mu\text{m}$ , citoplasma intensamente basófilo, relación núcleo/citoplasma variable. El número de lobulaciones varía entre 2 y 7, su cromatina es densa o abierta, en bandas gruesas en algunas y difusa en otras. En los casos de núcleos bilobulados, éstos pueden estar unidos por un puente discretamente estrecho o una banda fina algo más larga de cromatina. Carecen de gránulos (Figuras 7, 8, 9, 10 y 11)

3. *Linfocitos activados.* Son células de mayor tamaño, entre 12 y 20  $\mu\text{m}$  de diámetro, redondeadas u ovoides, con citoplasma de color que fluctúa entre un azul moderado hasta una intensa basofilia, una amplia relación núcleo/citoplasma, el núcleo redondeado o irregular por la presencia de indentaciones en el borde; pueden tener a veces lobulaciones en número de 2 a 7. La cromatina es abierta de bandas gruesas. En ocasiones la cromatina se agrupa en la periferia del núcleo. Estas últimas carecen de gránulos (Figuras 12, 13 y 14).

4. *Linfocitos atípicos.* Son linfocitos de aspecto plasmocitoide y sus variantes, similares a los descritos en mononucleosis infecciosa u otras virosis. Su tamaño varía entre 7 y 12  $\mu\text{m}$ . La relación núcleo/citoplasma es variable con citoplasma intensamente basófilo y cromatina en forma de bandas gruesas muy apretadas. Generalmente la forma del núcleo y del citoplasma es redondeada.

**c. Hallazgos morfológicos en los monocitos (monocitos activados).** Se observaron varios cambios, como un incremento en el tamaño con diámetro de 20 a 25  $\mu\text{m}$ , presencia de múltiples vacuolas citoplasmáticas, elongaciones del citoplasma, de aspecto rasgado, que es grisáceo, opaco y con amplia relación núcleo/citoplasma; núcleo con formas irregulares variadas, con cromatina en bandas finas separadas usualmente. El aspecto general de muchas de estas células es histioide. Tienen pocas granulaciones. Se observan células intermedias en cuanto a los cambios morfológicos (Figura 15).

**d. Correlaciones de los hallazgos morfológicos con PET.**

1. *Linfocitos vesiculados.* En 10 (38.0%) de 26 casos y 1 (5.0%) de 20 controles se vio esta característica (p, 0.0001; OR, 30.4, (95%); LC, 3.45-1338.42). Sensibilidad (Sen): 61.0%; especificidad (Esp), 95.0%; falsos positivos (FP), 5.0%; falsos negativos (FN), 38.4%; valor predictivo positivo (VPP), 94.1%; valor predictivo negativo (VPN), 65.5%. VPP ajustado a la prevalencia de PET en Tumaco (1/1000), 1.2%. VPN ajustado, 99.9%.

2. *Linfocitos multilobulados.* En 12 (46.1%) de 26 casos y en ninguno de los 20 controles se observaron estas células con núcleos polilobulados (p, 0.0003637). Sen, 46.0%; Esp, 100.0%, FP, 0.0%; FN, 53.8%; VPP, 100.0%, VPN, 58.8%; VPP ajustado, 100.0%; VPN ajustado, 99.9%.

3. *Linfocitos activados.* En 23 (88.5%) de los 26 individuos con PET y en ninguno de los 20 controles hubo estas características (p, 0.00000001). Sen, 88.4%; Esp, 100.0%; FP 0.0%; FN, 11.53%; VPP, 100.0%; VPN, 86.9%; VPP ajustado, 100.0%; VPN ajustado, 99.9%.

4. *Linfocitos atípicos.* De los 26 pacientes con PET, 9 (34.6%) tuvieron linfocitos atípicos comparados con 16 (80.0%) de los controles (p, 0.003; OR, 0.13; 95.0% IC, 0.02-0.60). Sen, 34.6%; Esp, 20.0% FP, 80.0%; FN, 65.0%; VPP, 36.0%; VPN, 19.0%; VPP ajustado, 0.043%; VPN ajustado, 99.6%.

5. *Monocitos activados.* Sólo 22 (84.6%) de los 26 casos y ninguno de los 20 controles tuvieron este tipo de células (p: < 0.00000001). Sen, 84.6%; Esp, 100.0%; FP, 0.0%; FN, 15.38%; VPP, 100.0%; VPN, 83.3%; VPP ajustado, 100%; VPN ajustado, 99.9%.

**DISCUSION**

Los linfocitos en reposo normales se pueden clasificar en 2 grandes grupos:

1) *Linfocitos pequeños:* con escaso citoplasma azul oscuro, carecen de gránulos, el núcleo es generalmente redondo de cromatina compacta, color púrpura y ocasionalmente indentado<sup>1-4</sup>.

2. *Linfocitos grandes:* tienen mayor cantidad de citoplasma azul claro, pueden tener gránulos de color rojo, redondeados, de un halo claro, llamados gránulos azurófilos. El núcleo es oblongo, ligeramente excéntrico, cromatina medianamente púrpura incompletamente agregada, el núcleo tiene una o más escotaduras discretas<sup>1-4</sup>. Algunos linfocitos T<sub>4</sub> y T<sub>8</sub> en reposo tienen una estructura citoplasmática llamada "cuerpos de Gall", que contienen lisosomas y una gota de lípidos. Estos cuerpos de Gall corresponden a los gránulos azurófilos. Hay una tercera población de linfocitos con morfología granular llamada grandes linfocitos granulares con un mayor número de tales elementos. Estos carecen de los marcadores convencionales para células B y T. Los gránulos no se encuentran en las células B en reposo<sup>1,3,4</sup>.

Los linfocitos activados descritos en la literatura tienen

un citoplasma muy basófilo, aumento de volumen y, además, la cromatina se puede ver en cualquiera de las fases de la división celular. Sin embargo, las polilobulaciones descritas en el presente trabajo y en publicaciones previas de pacientes con HAM, son características de esta enfermedad<sup>5</sup>. Este tipo de células presentó las cifras más altas en los valores predictivos.

Los monocitos normales son más grandes que los "grandes linfocitos" (10-18  $\mu\text{m}$ ), tienen núcleo en forma de herradura, redondo, clivado o con 2 ó más lóbulos separados por filamentos. A menudo contienen gránulos azurófilos. El color del citoplasma es azul-gris opaco. La cromatina es más reticulada que en el linfocito y no se agrupa en la periferia. Frecuentemente al activarse tienen pseudópodos romos y claros y vacuolas digestivas<sup>1</sup>. Los monocitos activados descritos en este artículo tienen además un mayor tamaño que lo normal (20-25  $\mu\text{m}$ ) y la cromatina en bandas finas de bordes netos, abundantes vacuolas digestivas. Estos cambios no se han descrito antes en los monocitos de pacientes con PET y representan un hallazgo importante con VPP y VPN de 100% y 83.3%, respectivamente.

Otro aspecto muy importante descrito en el presente trabajo, pero no en publicaciones previas, fue la presencia de vesiculaciones en la membrana citoplasmática, tanto las de base ancha como aquellas unidas a las células por un tallo de la misma membrana, las que se pudieron encontrar en linfocitos de aspecto normal en los demás parámetros o también en linfocitos anormales con cambios nucleares y basofilia intensa en el citoplasma. Aunque a veces se pueden observar linfocitos pequeños con vesiculaciones de este tipo muy pequeñas, en personas normales, en general no tienen más de una de estas estructuras por célula y suelen ser muy raras. En el presente trabajo se observó su presencia en linfocitos pequeños e intermedios en cantidad variable llegando a estar presente en cantidades hasta de 5-6 estructuras por célula. Su VPP fue 94.1% y su especificidad 95.0%.

Otra anomalía vista en algunos de los presentes casos y descrita por primera vez, fue la presencia de elongaciones del núcleo, que en ocasiones se prolongan en el interior de las vesículas descritas a través de su tallo en forma muy estrecha hasta su interior, para abrirse holgadamente en las mismas. El fenómeno causa la impresión de una "herniación" de un fragmento nuclear, cuando se efectúa en las vesiculaciones de tallo estrecho. En cuanto a los linfocitos multilobulados ya descritos en la literatura, se encontraron en 12 de los 26 casos y en ninguno de los 20 controles, para dar un VPP y Esp de 100.0%. Los linfocitos atípicos descritos en esta y en otras infecciones virales carecen de especificidad que los asocien con PET.

Los hallazgos consistentes en combinaciones varias de linfocitos o monocitos activados y/o núcleos polilobulados representan una forma simple y eficaz de hacer un diagnóstico presuntivo de infección por HTLV-I en un paciente con signos neurológicos sugestivos de PET ya que sus valores predictivos positivos fueron 100.0%. El no hallar ninguna de las anomalías descritas hace también muy improbable una serología positiva por este virus en las circunstancias clínicas mencionadas, porque sólo uno de los 26 casos carecía de todas estas alteraciones en su extendido periférico. El no encontrar linfocitos activados confiere una probabilidad de 98.0% (VPN) de no tener PET asociada con HTLV-I. Para los monocitos activados el VPN fue 86.4%.

Los linfocitos vesiculados tuvieron un VPP de 94.0%, es decir, su presencia confiere un alta probabilidad de tener PET-HTLV-I, aunque su sensibilidad fue sólo de 61.0% y su VPN de 65.5%, e indica que su ausencia no predice correctamente la carencia de esta entidad. Al ajustar los VPP a la prevalencia de la PET en la población general para los hallazgos de linfocitos activados, monocitos activados o linfocitos multilobulados, estos datos permanecieron en 100.0%, lo cual sugiere que encontrar cualquiera de estas anomalías en un extendido periférico, debe implicar la búsqueda de PET-HTLV-I en el individuo portador de estos hallazgos.

Sin embargo, se requieren estudios futuros en una población significativa de individuos seropositivos asintomáticos, con el propósito de valorar estos datos en la población y verificar si los hallazgos se relacionan con la asociación virus-enfermedad o solamente con el virus. Este estudio se encuentra ya en curso.

#### SUMMARY

The HTLV-I virus causes tropical spastic paraparesis (TSP). Some morphologic changes in the lymphocytes have been described in the peripheral blood. With the purpose of obtaining additional morphologic information on the peripheral blood, in the present study 26 seropositive patients for HTLV-I and with symptoms of the disease, as well as 20 healthy controls, all of them from the same areas of the city of Tumaco, were included. The results give more information not previously described as well as confirmation of the known facts, with a high predictive positive value (PPV) and specificity not only in the changes previously described in the literature, but also in those found in this study. The negative predictive value is also remarkable. Finally, upon adjustment of the PPV to the prevalence of the TSP in the general population for the findings of activated lymphocytes, activated monocytes or multilobulated lymphocytes, those changes remained

in the 100.0% which suggests that the presence of any of them in the peripheral blood, will point to the possibility of TSP-HTLV-I positive and this diagnosis must be confirmed.

#### AGRADECIMIENTOS

La página a color se imprimió merced a la colaboración de Laboratorios Lafranco S.A., de Cali, Colombia.

#### REFERENCIAS

1. Diggs, LW, Sturm, D & Bell, A. Linfocitos. Pp. 8-9. En *La morfología*

*de las células de la sangre humana*. En frotis de la sangre periférica y de la médula ósea teñidos con el colorante de Wright. Abbott Laboratories. Diggs, LW, Sturm, D & Bell, A (eds), 1971.

2. Zucker-Franklin, D, Greaves, MF, Grossi, CE & Marmont, AM. Función y patología. Pp. 321-343 y 348-524. En *Atlas de células sanguíneas*. Salvat Editores SA, Barcelona, 1981.
3. Roit, I, Brostoff, J & Male, D. Cells involved in immune response. Pp. 2.1-2.18. In *Slide Atlas of Immunology*. Roit, I, Brostoff, J & Male, D (eds), 1987.
4. Kapff, CJ & Jandl, JH. *Blood atlas and source book of hematology*. Little Brown Co, Boston, 1981.
5. Osame, M, Matsumoto, M, Usuku, K et al. Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to HTLV-I and adult T-cell leukemia like cells. *Ann Neurol*, 1987, 121: 117-122.
6. Morgan, OSC, Rodgers-Johnson, P & Gibbs, WN. Abnormal peripheral lymphocytes in tropical spastic paraparesis. *Lancet*, 1987, 2: 403-404.

## Cirugía de la trompa de Falopio: comparación de los resultados del uso de la técnica electromicroquirúrgica y la microcirugía láser.

Jaime Saavedra S., M.D.\*

#### RESUMEN

Para evaluar el efecto del láser de CO<sub>2</sub> como adyuvante de la microcirugía convencional, se revisaron retrospectivamente las historias de 146 mujeres operadas por compromisos en el factor tuboperitoneal. Se realizó microcirugía convencional en 76 casos, y microcirugía láser en 70. Las tasas de embarazo fueron para fimbrioplastia, 67.7% y 52.5%; salpingostomía, 31.2% y 26.6%; anastomosis, 61.0% y 73.3%, respectivamente. Se puede concluir que el láser de CO<sub>2</sub> tiene ciertas ventajas (precisión, hemostasia, capacidad de conservar más tejido reproductivo sano, rapidez y facilidad para realizar los procedimientos), pero no se demostró que fuera superior a la técnica microquirúrgica convencional. Se necesitan más experiencia y más estudios con un mayor tiempo de seguimiento para delinear el papel del láser de CO<sub>2</sub> como adyuvante de la microcirugía convencional.

El uso de diferentes tipos de láseres como herramienta terapéutica se ha expandido rápidamente en muchos campos de la medicina. En 1974 se adaptó el láser de CO<sub>2</sub> al microscopio operativo, para realizar cirugía reconstructiva de la pelvis. Los ginecólogos aprovecharon este adelanto, y lo han utilizado en cirugía

reconstructiva de las trompas de Falopio<sup>1,2</sup>. Klink et al.<sup>3</sup> informaron resultados favorables con el uso de láser de CO<sub>2</sub> en anastomosis tubárica en animales, así como en la reparación de trompas de Falopio obstruidas por hidrosálpinx.

Quienes promueven el uso del láser en la cirugía tubárica mencionan las siguientes ventajas: menor tiempo quirúrgico, menor sangrado durante la cirugía, daño tisular mínimo, menos formación de adherencias en el postoperatorio, menor dolor post-cirugía y menor riesgo de infección.

Muchos cirujanos de las trompas de Falopio guardan aún gran escepticismo sobre el verdadero valor del láser de CO<sub>2</sub> en esta cirugía. Debido a la controversia suscitada alrededor del uso del láser de CO<sub>2</sub> en la cirugía de la infertilidad, con el presente trabajo se ha querido evaluar el papel del láser de CO<sub>2</sub> en la microcirugía tubárica, en comparación con la microcirugía convencional.

#### MATERIAL Y METODOS

De febrero de 1983 a julio de 1988 se intervinieron 76 mujeres con la técnica microquirúrgica. A 23 de las pacientes que habían sido esterilizadas [17 por bandas de caucho (Falope ring) y 6 por la técnica de Pomeroy], se les realizó anastomosis tubárica según el tipo de

\* Profesor Asociado, Departamento de Ginecología y Obstetricia, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.