



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"CUAUTITLAN"

CARACTERISTICAS DEL PATRON DE  
ANTICUERPOS ANTIPLAQUETAS EN  
TRANSFUSION SANGUINEA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OPTAR POR EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

BERTHA ALICIA AMARO SAENZ

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

1986



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

	Página
I.- INTRODUCCION - - - - -	1
II.- GENERALIDADES - - - - -	3
1. Historia - - - - -	3
2. Fisiología de plaquetas - - - - -	8
3. Fisiología de linfocitos - - - - -	12
4. Características inmunológicas - - - - -	15
5. Respuesta inmune - - - - -	17
6. Antígenos - - - - -	21
7. Antígenos plaquetarios - - - - -	24
8. Sistema HLA - - - - -	29
9. Anticuerpos - - - - -	34
10. Anticuerpos antiplaquetarios - - - - -	41
11. Patología asociada a anticuerpos antiplaquetarios - - - - -	42
12. Púrpura post-transfusional - - - - -	46
13. Fenómeno refractario - - - - -	47
14. Características metodológicas para estudiar anticuerpos antiplaquetarios - - - - -	48
15. Método propuesto: Inhibición de la migración de plaquetas (IMP) - - - - -	55
16. Método de referencia: Linfocitotoxicidad (LCT)	57
III.- OBJETIVOS - - - - -	59

IV.-	MATERIAL Y METODOS	60
	1. Material Biológico	60
	2. Preparación de soluciones	60
	3. Inhibición de la migración de plaquetas	64
	a. Fundamento	64
	b. Material	64
	c. Procedimientos	64
	d. Interpretación de resultados	70
	4. Linfocitotoxicidad	72
	a. Fundamento	72
	b. Material	72
	c. Procedimientos	73
	d. Interpretación de resultados	77
	5. Métodos estadísticos	78
V.-	RESULTADOS	80
VI.-	DISCUSION	90
VII.-	CONCLUSIONES	95
VIII.-	BIBLIOGRAFIA	97

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Ac.....	Anticuerpos
AcAP.....	Anticuerpos Antiplaquetas
Ag .....	Antígeno
C <sub>H</sub> 1,C <sub>H</sub> 2,C <sub>H</sub> 3,C <sub>H</sub> 4.....	Constante pesada 1,2,3 y 4
C <sub>L</sub> .....	Constante ligera
cM.....	Centimorgans
CRIR.....	Calificación relativa de la intensidad de la reacción
DI,DII,DIII,DIV.....	Dominios I,II,III y IV de las inmunoglobulinas
Fab.....	Fragmento de unión al antígeno
Fc.....	Fracción cristalizable
HLA.....	Antígeno de leucocitos humanos
<sup>+</sup> H <sub>3</sub> N.....	Grupo amino
IgD,IgG,IgM.....	Inmunoglobulina D,G y M
IL1,IL2.....	Interleucina 1 y 2
IMP.....	Inhibición de la migración de plaquetas
LCT.....	Linfocitotoxicidad
<sup>-</sup> OOO.....	Grupo carboxilo
PHA.....	Fitohemaglutinina
PRP.....	Plasma rico en plaquetas
V <sub>H</sub> .....	Variable pesada
V <sub>L</sub> .....	Variable ligera
SSF.....	Solución salina fisiológica

I. INTRODUCCION

La práctica médica tan extendida en pacientes que requieren transfusiones sanguíneas, ha provocado en muchos de ellos problemas de aloinmunización debido a que reciben frecuentemente transfusiones, ya sea de paquetes globulares, que generalmente contienen la mayoría de los leucocitos y plaquetas de la sangre, o transfusiones plaquetarias; todo esto desencadena la formación de anticuerpos séricos antiplaquetas y antileucocitos y hacen refractario al receptor a esta terapia.

Las alternativas metodológicas en tales pacientes es la de obtener paquetes globulares "pobres" en plaquetas y leucocitos, o bien cuando el paciente necesita plaquetas, se le suministre aquellas que sean compatibles inmunológicamente. Estos métodos no son de uso generalizado en cualquier banco de sangre debido a que implican la detección previa de anticuerpos antiplaquetas o antileucocitos.

Debido a lo anteriormente expuesto, es conveniente valorar métodos sencillos y accesibles, en operación y costo, para la detección de anticuerpos antiplaquetas en el laboratorio clínico.

En el presente trabajo se revisan aspectos fisiológicos e inmunológicos relacionados a las plaquetas y los linfocitos, planteándose así mismo algunas situaciones patológicas que se originan por las disfunciones plaquetarias y se valoran los resultados obtenidos por dos técnicas: inhibición de la migración de plaquetas (IMP) y linfocitotoxicidad (LCT) para la detección de AcAP en pacientes politransfundidos y su utilización en cualquier laboratorio de banco de sangre.

## II. GENERALIDADES.-

### 1. HISTORIA.

En la antigüedad a la sangre se le asociaba con prácticas filosófico-religiosas, durante la edad media se intentaron transfusiones sanguíneas provocando la muerte tanto de donadores como de receptores y fue considerada en esa época la posibilidad de transfusiones de sangre como medida terapéutica, no obstante el desconocimiento de su función (1). Debido a la falta de conocimiento fisiológico existente entonces sobre sangre y transfusión, se realizaron estudios biológicos aislados empleando animales de diferentes especies y características, hasta que a fines del siglo XVIII se efectuaron transfusiones sanguíneas (2) y estos estudios aportaron nuevos conocimientos referentes a este procedimiento, tales, como que un animal con pérdida importante de sangre sobrevivía si se le transfundía con sangre de otro animal de su especie, pero moría al hacerlo con la de un animal distinto.

A Blundell, a partir de 1818, se le considera el padre de la transfusión sanguínea moderna por su contribución en el procedimiento para transfundir sangre a pacientes (3). Las transfusiones se realizaban con sangre completa, por lo que las



reacciones indeseables, seguramente hemolíticas, se presentaban en gran proporción.

Landsteiner, en el año de 1900 (4), demostró la presencia de Ag del grupo sanguíneo ABO en la membrana de eritrocitos humanos. En 1940 (5) Landsteiner y Wiener describieron otro sistema antigénico eritrocitario: el sistema Rh-Hr. Estos hallazgos mejoraron la transfusión sanguínea y las reacciones posttransfusionales por hemólisis descendieron considerablemente. Dausset (6) fué el primero en informar de reacciones posttransfusionales con otro tipo de células diferentes a eritrocitos, como los leucocitos y plaquetas. Salmon demostró la existencia de antígenos en leucocitos y plaquetas con mayor antigenicidad que los antígenos eritrocitarios debido a que poseen una estructura protéica y un gran polimorfismo, por lo que resultan las células más extrañas entre humanos. Miescher y Fauconnet en 1954 (7) reportaron la existencia del primer aloanticuerpo antileucocito en un paciente politransfundido ; posteriormente Dausset (8) definió el aloantígeno leucocitario llamado MAC, al que después se le denominó HLA-A2 por pertenecer a este grupo, así mismo Payne (9) observó que ciertas mujeres durante su embarazo creaban anticuerpos anti-HLA. Después de estos hallazgos se concluyó que los problemas posttransfusionales con leucocitos y plaquetas se debían a estos

antígenos, por lo que a partir de este momento empieza a perfilarse la transfusión con componentes sanguíneos y aparecen los trabajos sobre técnicas de fraccionamiento de sangre.

Actualmente la terapia con fracciones de sangre y componentes sanguíneos es el resultado de los conocimientos obtenidos de la inmunología genética, la fisiología de la membrana citoplasmática, el metabolismo del eritrocito, la fisiología de las plaquetas y granulocitos, el metabolismo y función de las proteínas plasmáticas, etc.; de tal manera que para recobrar la hemostasia ahora se transfunde con el componente sanguíneo necesario para el paciente (10).

Estos avances han motivado la creación de una diferente operación del banco de sangre en los años ochentas, principalmente originado por la necesidad de transfusión de plaquetas y granulocitos, esto permite también el planteamiento y ejecución de investigaciones para comprender los sistemas inmunitarios de Ag y Ac, consiguiéndose así mismo una mejoría en las pruebas cruzadas que se realizan entre receptor y donador previas a la transfusión y de los mecanismos de destrucción originados por estos fenómenos inmunológicos (11).

La transfusión de plaquetas se ha empleado para controlar hemorragias en pacientes que presentan tales cuadros (12), el desarrollo de aparatos especializados ha permitido la obtención de plasma rico en plaquetas y concentrados plaquetarios de sangre completa de manera simple y aséptica (1).

Se ha observado que después de varias transfusiones de plaquetas, algunos pacientes desarrollan un fenómeno "refractario", esto es; que el paciente no responde a la transfusión de plaquetas debido a que se ha producido en él una aloinmunización hacia Ag sobre la membrana de las plaquetas. Los AcAP tienen una gran trascendencia porque su aparición puede significar la anulación del efecto hemostático de las plaquetas transfundidas (13), no obstante recientemente se ha demostrado que no todos los pacientes que reciben transfusiones de plaquetas desarrollan Ac contra ellas y los que son transfundidos con paquetes globulares pueden producirlos debido a la contaminación con granulocitos y plaquetas. Aún cuando los paquetes globulares se encuentren "empobrecidos" de dichas células, siempre existirá un pequeño porcentaje de contaminación capaz de producir aloinmunización.

En los últimos años se desarrolló una nueva técnica para la transfusión de plaquetas denominada plaquetoferesis, en la -

cual se colectan grandes cantidades de plaquetas de un solo donador para transfundir al paciente. Este procedimiento previene o retrasa la isoimmunización en pacientes sometidos a terapia prolongada de transfusión de plaquetas, además de que permite la obtención de plaquetas compatibles para pacientes altamente inmunizados (14).

En un principio se pensó que transfundiendo con plaquetas HLA compatibles a los pacientes aloimmunizados se resolvía el fenómeno "refractario", sin embargo; con el uso de plaquetas HLA compatibles se observó que esta no era la solución final puesto que, aproximadamente el 25% de las transfusiones de plaquetas HLA-compatibles a cuatro antígenos del sistema no daban resultados satisfactorios (15). Estas observaciones han provocado gran interés en cuanto a la serología de plaquetas y a la búsqueda de una prueba cruzada eficiente.

Desde 1950 los investigadores se han esforzado en definir a los aloantígenos plaquetarios y sus correspondientes Ac, pero solo hasta hace pocos años se han obtenido resultados interesantes. En la década pasada se desarrollaron una gran variedad de métodos para la detección de AcAP, pero la mayoría son complicados, ya que requieren de aparatos y equipos costosos y algunos no poseen la sensibilidad deseada, por lo que la -

mayoría de los especialistas prefieren el empleo simultáneo de varias técnicas, incluyendo la determinación de Ac anti-leucocitos (16).

## 2. FISILOGIA DE PLAQUETAS.

Las plaquetas tienen un papel fundamental en la hemostasia, manteniendo la integridad de las células endoteliales de los vasos sanguíneos y participando en la formación del tapón hemostático cuando se produce un deterioro de la continuidad de la pared vascular. Las plaquetas se originan del megacariocito, poseen forma discoide con un diámetro longitudinal de 2 a 3 micras y citoplasma de color azul pálido cuando se tiñe con colorante de Wright; con mitocondrias, vacuolas y diversas partículas densas (figura 1). Cuando la plaqueta es estimulada por una lesión vascular o por un agente inductor, se observa un cambio de forma de disco a esfera, con la emisión de pseudópodos lo cual facilita la unión a otras plaquetas (17,18).

En la estructura de las plaquetas se diferencian varias zonas: a) zona periférica que consta de varias capas, la más externa llamada glucocálix se encuentra constituida por glucoproteínas ricas en glúcidos, con un papel muy importante en la recepción de estímulos, en la adhesión y agregación plaquetaria; -

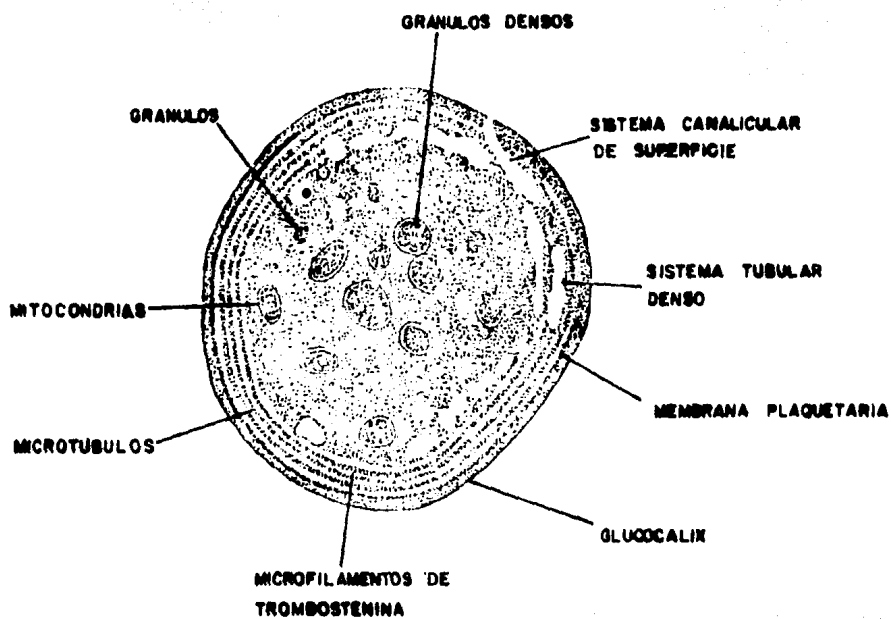


Figura 1. Representación esquemática de la estructura plaquetaria (23, 25).

la membrana formada por proteínas y fosfolípidos, los cuales participan en la agregación y coagulación, constituyendo el factor-3 - plaquetario y la región de submembrana que presenta un sistema canalicular de superficie, a través del cual tiene lugar el contacto de la plaqueta con el exterior y la salida del contenido de gránulos durante el proceso de secreción, un sistema tubular denso con las enzimas necesarias para la síntesis de prostaglandinas que participan en el proceso de contracción y relajación de la plaqueta y un sistema de filamentos contráctiles. b) zona de soporte, formada por una banda de microtúbulos que integra un verdadero citoesqueleto y una banda de microfilamentos de trombostenina, proteína compuesta de actina y miosina que se une con la zona de submembrana - siendo responsable de la contracción, cambio de forma, emisión de pseudópodos, motilidad y quimiotaxis de la plaqueta y c) zona de organelos donde se hallan gránulos conteniendo factor-4 plaquetario, fibrinógeno, tromboglobulina y factor mitogénico; gránulos densos de serotonina, calcio y nucleótidos como ATP, ADP y AMP que son liberados durante la secreción; mitocondrias con ATP, ADP y AMP; glucógeno, microsomas y lisosomas con enzimas hidrolíticas (19) (figura 1).

Las plaquetas constituyen la primera y más importante respuesta contra una pérdida accidental de sangre, se acumulan casi

instantáneamente a nivel de una lesión vascular, proporcionan do un cierre temporal, para posteriormente estimular la forma ción de un bloqueo permanente. Durante el primero participan fundamentalmente las plaquetas y la pared vascular, los fenómenos que se llevan a cabo son la adhesión a la pared vascular dañada, cambio de forma y contracción de las plaquetas, reacción de liberación o secreción del contenido de los gránulos y agregación o formación del trombo plaquetario (17).

La adhesión se produce a nivel de una protefna del glucocálix llamada glucoprotefna I o glucocalicina con el tejido conjuntivo subendotelial, específicamente con el colágeno, parece ser que el factor VIII es imprescindible durante el fenómeno de adhesión, este fenómeno no requiere de energía, ni la presencia de iones calcio; en el momento de la adhesión la plaqueta se vuelve esférica, emite pseudópodos y los microfilamentos producen una contracción y relajación dependiente de calcio, a la vez, se estimula la síntesis de prostaglandinas y se libera el contenido de gránulos; si el estímulo es fuerte se efectúa la agregación y formación de fibrina para estabilizar el trombo plaquetario, haciendo el proceso irreversible(19). En cuanto a la síntesis de prostaglandinas se han destacado dos derivados prostanoides: el tromboxano A2 sintetizado por la plaqueta y potente inductor de la agregación y contracción



vascular y la prostaciclina sintetizada en el endotelio, inhibidor de la agregación y productor de vasodilatación. Se ha sugerido la hipótesis de que las prostaglandinas son mensajeros químicos en la secreción del contenido de gránulos (20).

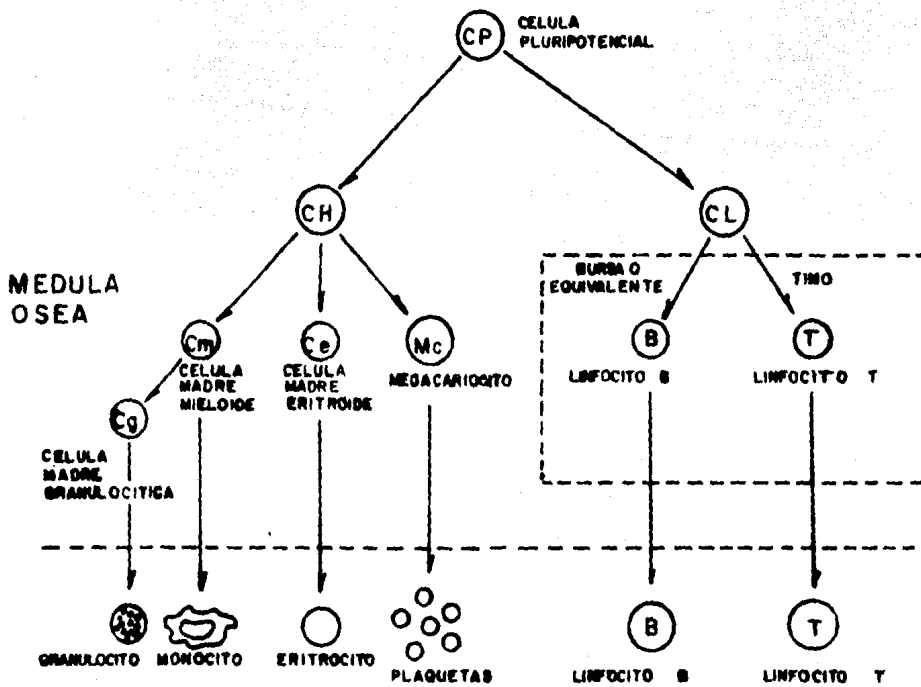
Además de operar cierres vasculares, las plaquetas parecen desempeñar un papel casi continuo, manteniendo la integridad vascular normal. Los pacientes con trombocitopenia tienen disminuida la resistencia capilar por lo que les aparecen petequias después del menor traumatismo extrínseco o cambio intrínseco de presión arterial; probablemente estas lesiones estén causadas por descamaciones de la superficie del endotelio, que en condiciones normales se cierran inmediatamente por plaquetas, pero en pacientes trombocitopénicos permanecen abiertas y permiten el escape de pequeñas cantidades de sangre (21).

### 3. FISILOGIA DE LINFOCITOS

Estructuralmente son células redondas que miden de 8 a 12 micras de diámetro, constituyen del 20 al 50% de los leucocitos de la sangre periférica, al teñirse con colorante de Romanowsky presentan un pequeño borde de citoplasma homogéneo de color azul pálido, que puede contener unos cuantos gránulos lisosó-

micos azurófilos y algunas vacuolas; el núcleo ocupa la mayor parte de la célula con bloques de cromatina nuclear separados redondeado o ligeramente indentado, a menudo se observa un pequeño nucleolo (22, 23, 24).

Los linfocitos presentan dos tipos de células que se derivan de células pluripotenciales, comunes a otras células hematopoyéticas y tienen una diferenciación específica de acuerdo a marcadores de superficie, aquellos que se diferencian en el timo son los linfocitos T y los que hacen su diferenciación en el equivalente a la bursa de fabricio en el humano son los linfocitos B, (figura 2). Estos dos tipos de células difieren notablemente en su función, las células B se vinculan con los procesos inmunológicos humorales, mediados a través de Ac y son precursores de las células plasmáticas secretoras de Ac. Las células T se relacionan con la respuesta inmune originada por células y también interactúan con los linfocitos B, ayudando a regular la producción de Ac. Existen células T con diferentes funciones inmunológicas, unas tienen capacidad citotóxica directa contra células extrañas, otras regulan la respuesta de las células B con un efecto de ayuda ó cooperación, otras con acción supresora; mientras tanto otras guardan la información para un posterior contacto con el antígeno que las originó, llamadas células de memoria (25, 26).



S A N G R E

Figura 2. Diferenciación de las células sanguíneas a partir de la célula pluripotencial de médula ósea (28).

Los linfocitos T tienen la propiedad de fijar eritrocitos de carnero formando "rosetas" que es el mejor marcador de los linfocitos T humanos y responden a mitógenos como la FHA y concanavalina A. Las células B son los linfocitos que poseen en su superficie inmunoglobulinas, tanto IgM como IgD, también tienen receptores para el componente C3 de complemento y la Fc de la IgG (24, 25, 27), (figura 3).

La bursa de las aves o su equivalente no conocido en el humano y el timo se ocupan de la diferenciación del linfocito primario a partir de células pluripotenciales y se denominan órganos linfoides primarios. Los órganos linfoides secundarios como el bazo, ganglios linfáticos asociados con intestino y bronquios, son poblados por linfocitos T y B diferenciados, éstos proliferan después de la estimulación antigénica (24, 25), (figura 2).

#### 4. CARACTERISTICAS INMUNOLOGICAS

La respuesta del organismo a estímulos extraños a él, origina lo que los investigadores han llamado inmunidad, en sí es el principal mecanismo con que se cuenta para combatir agentes agresores.

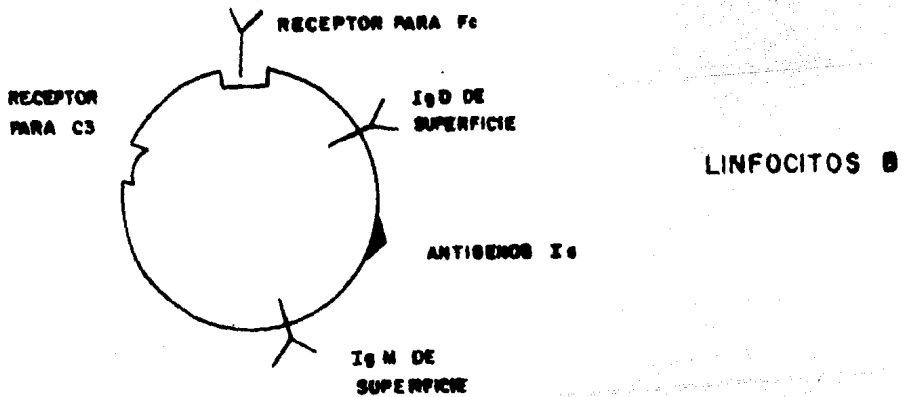
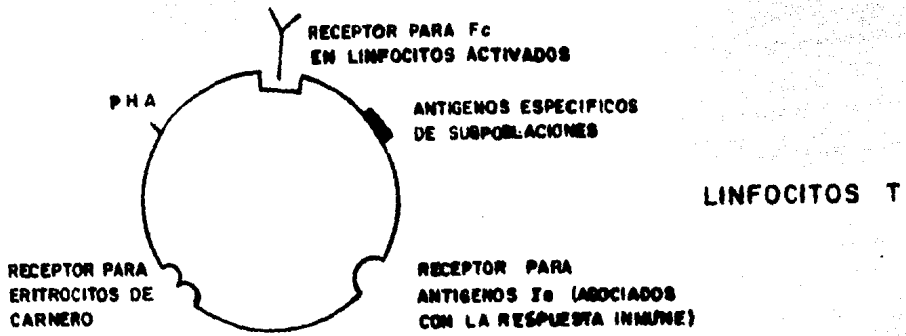


Figura 3. Marcadores de superficie de linfocitos T y B (24, 25 ).

La resistencia a infecciones puede ser de tipo natural, la cual es inespecífica, o de tipo adquirida como resultado de una respuesta inmune específica (28), (figura 4).

## 5. RESPUESTA INMUNE

LA respuesta inmune es el mecanismo a través del cual el organismo reconoce y elimina sustancias que le son extrañas y que generen esta respuesta, siendo de origen exógeno o endógeno (25). Normalmente requiere de la cooperación de tres tipos de células: macrófagos, linfocitos T y linfocitos B; como se muestra en la (figura 5).

Los macrófagos tienen como función presentar el Ag en forma ordenada a las células T, el linfocito T es estimulado por dos señales de macrófago, una es la presentación del Ag en forma ordenada con la producción de IL-1 y la otra es un Ag de superficie denominado Ia (asociado a la región I del complejo principal de histocompatibilidad); la I -1 induce la síntesis de IL-2 por las células T y es la acción de ésta la que permite que prosiga la activación total de la célula T. Una vez estimulados los linfocitos T, éstos proliferan produciendo tanto células auxiliares ó "cooperadoras" que facilitan la respuesta de células B, como células T de

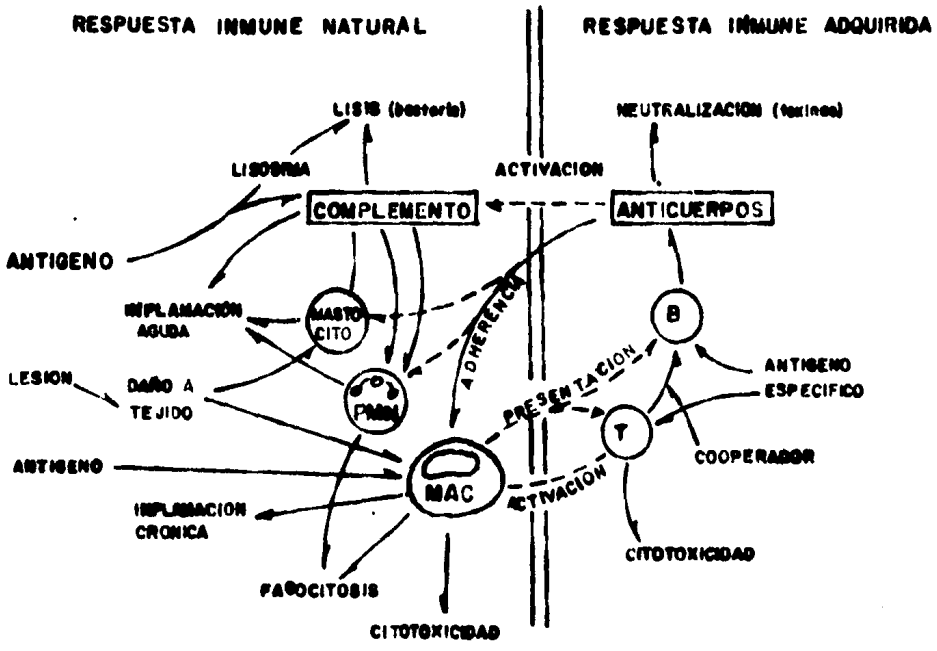


Figura 4. Mecanismos generales involucrados en la Inmunidad (28).

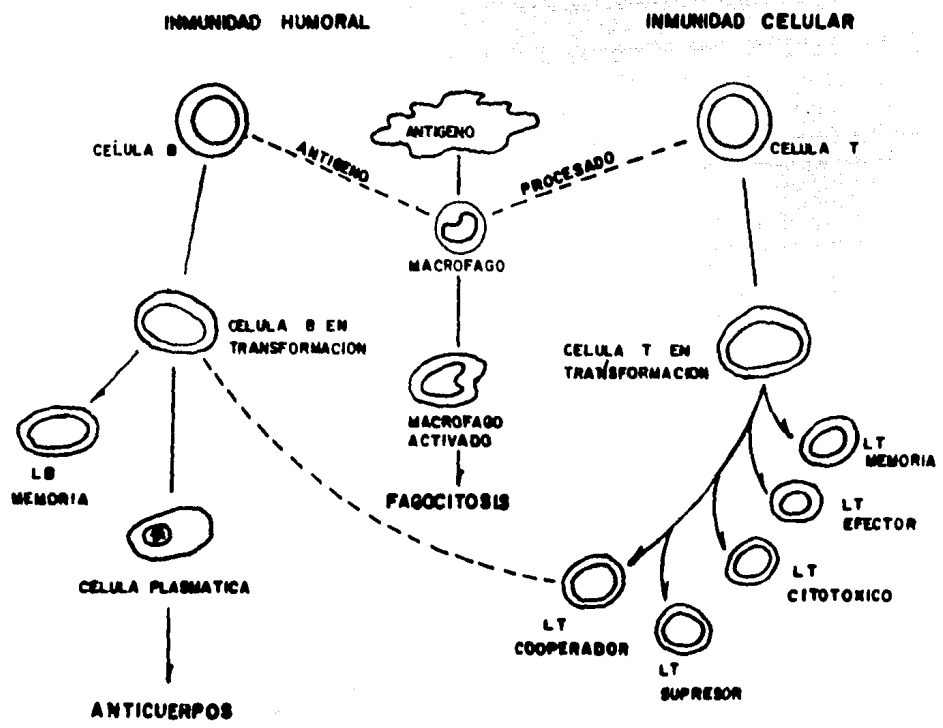


Figura 5. Mecanismo de cooperación celular en la respuesta inmune (34).



memoria que guardan la información para un segundo estímulo, células citotóxicas que matan a otras células por contacto directo. Los linfocitos T "activados" además producen sustancias solubles llamadas linfocinas que atraen y activan a macrófagos e inducen la transformación de células T no activadas en células T "activadas" y así amplificar la respuesta inmune. Parece ser que la activación de células T supresoras no requiere del macrófago, ya que el Ag es capaz de activarlas directamente (29,30).

Los linfocitos B también desencadenan su respuesta por dos señales, una es el propio Ag que induce una respuesta muy pobre y la otra es el factor "cooperador" de la célula T. Las células B estimuladas o "activadas" proliferan produciendo por un lado Ac específicos contra el Ag que estimuló esta respuesta y por otro lado dando lugar a células de memoria. Para la regulación de la respuesta inmune también se requiere del linfocito T supresor que produce sustancias supresoras capaces de reducir o inhibir la producción de Ac, así como la inducción de Ac anti-idiotipo (25,30).

En una respuesta inmune primaria la producción de Ac es de tipo IgM principalmente. Durante un segundo estímulo el Ag interactúa con las células T y B de memoria generadas

por el primer estímulo antigénico por lo que la reacción es más rápida y la producción de Ac es predominantemente de tipo IgG (25).

La respuesta inmune provocada por una transfusión de sangre incompatible y que se conoce como reacción post-transfusional es una respuesta en contra de Ag de los sistemas ABO, Rh-Hr, HLA u otros encontrados en las células sanguíneas (cuadro 2), ya sea del receptor o del donador y sigue el patrón de una respuesta inmune humoral (31).

## 6. ANTIGENOS

Las características fisicoquímicas de los Ag son muy importantes para que se lleve a cabo una síntesis de Ac.

Cuando una sustancia extraña que se encuentra en el organismo es capaz de estimular una respuesta inmune se le denomina Ag y el grado de la respuesta en contra de él depende de su inmunogenicidad. A la porción estructural del Ag que reacciona con el sitio activo del Ac se le conoce como determinante antigénico (24).

Los Ag pueden ser moléculas de polisacáridos, como los Ag de

Cuadro 2.- Respuesta inmune a diferentes tipos de antígenos celulares (31).

Antígeno	Anticuerpo Predominante	Características de la Reacción Ag-Ac
ABO	IgM	Hemólisis intravascular por completo
Rh-Hr	IgG	Hemólisis extravascular por macrófagos
HLA	IgG	Lisis extravascular por macrófagos

grupo sanguíneo ABO que se localizan en membranas celulares o disueltas en el plasma y que estimulan una respuesta humoral principalmente de tipo IgM; y proteínas macromoleculares como las sustancias de grupo sanguíneo Rh-Hr y HLA que inducen una respuesta humoral de tipo IgG primordialmente (31).

Las proteínas son mejores inmunógenos que otras sustancias y producen una respuesta de inmunoglobulinas de varios tipos por ser Ag timodependientes (32).

El tamaño de la molécula es importante ya que estructuras pequeñas no son inmunogénicas a diferencia de estructuras con peso molecular superior a 100,000 daltons y que son buenos inmunógenos. Es también indispensable una complejidad química y estructural como determinante antigénico, los copolímeros compuestos de dos o más unidades aumentan su inmunogenicidad con respecto a los homopolímeros (24,33).

Otros factores que modifican la inmunogenicidad son: la cantidad de Ag que se administre, ya que si es excesiva o insuficiente la respuesta inmune suele ser menor; la vía de entrada, por ejemplo, vías que lleven al Ag a espacios vasculares dan origen a la producción de Ac, mientras que otras vías como la intradérmica producen una sensibilidad celular; las

diferencias entre especies provocan una mayor inmunogenicidad cuando es introducida una sustancia de una especie a otra. En cuanto al estado del animal influyen una gran cantidad de factores tales como la edad, composición genética, etc. (24,32, 34).

## 7. ANTIGENOS PLAQUETARIOS

Los Ag presentes sobre la membrana de la plaqueta son los siguientes: a) Ag del grupo sanguíneo ABO, los cuales comparte con todas las células del organismo además de los eritrocitos, b) Ag del sistema HLA, que también se encuentran en todas las células del organismo, pero principalmente sobre la membrana de los leucocitos y c) Ag específicos de plaquetas que no comparte con ninguna otra célula descrita hasta el momento (35) (figura 6).

Los Ag eritrocitarios del sistema ABO se han demostrado en la membrana de las plaquetas de individuos del grupo sanguíneo correspondiente (36) y existen evidencias de que tales sustancias son absorbidas del plasma (37). Aster (38) observó que cuando se transfundía con plaquetas ABO incompatibles a un receptor que presentaba títulos altos de isohemaglutininas la función plaquetaria recobrada era menor que en los pacien-

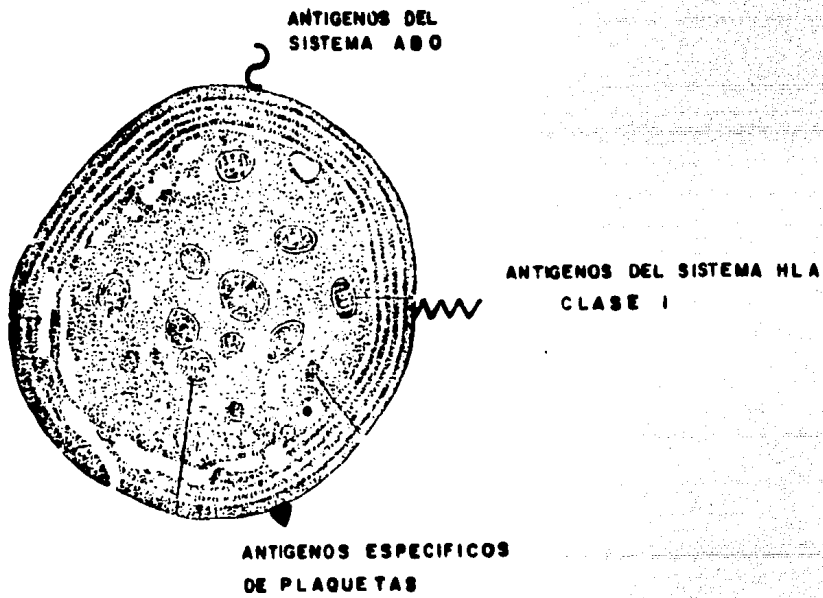


Figura 6. Representación esquemática de los antígenos de la membrana de la plaqueta (35).

tes que no los tenfa. Duquesnoy (39) observó que en pacientes aloimmunizados después de transfusiones con plaquetas ABO incompatibles, la recuperación de la función de éstas disminuyó en un 23% de lo normal, al igual que en pacientes que reciben transfusiones de plaquetas de donadores HLA incompatibles.

En lo que se refiere al sistema Rh-Hr, no se ha demostrado ninguno de sus Ag sobre la superficie de plaquetas. En otros estudios realizados se observó que las plaquetas de grupo sanguíneo Rh<sup>o</sup>(D) positivas sobreviven normalmente en pacientes con Ac anti Rh<sup>o</sup>(D) (40).

Los Ag del sistema HLA más relevantes sobre la membrana de la plaqueta son los del locus HLA-A y HLA-B; éstos se encuentran presentes en cantidades muy variables sobre todas las células del organismo (40,41), siendo mayores en linfocitos; por lo que los linfocitos son las células de elección para determinar el fenotipo de HLA del individuo (36). Existen algunas controversias respecto a si se encuentran presentes sobre la plaqueta los Ag del locus HLA-C, dado que resultados obtenidos en varios estudios muy sensibles parecen indicar que si los hay, pero en cantidades muy pequeñas, en cambio; los antígenos del locus HLA-D/DR, que existen sobre los linfocitos B, linfocitos T activados, monocitos y macrófagos, no se -

presentan en las plaquetas (35,36). Con base al razonamiento anterior, los Ag del locus HLA-C y HLA-D/DR no se toman en cuenta en la práctica de transfusión de plaquetas. Se ha visto que los aloanticuerpos producidos contra el sistema HLA en pacientes politransfundidos pueden conducir a un fenómeno llamado "refractario", en el cual no se recobra la función esperada con la transfusión de plaquetas, debido a una destrucción plaquetaria por Ac (42).

Hasta la fecha se han descrito cinco sistemas antigénicos característicos de la membrana plaquetaria. Van Loghem (43) y van der Weerd (44), utilizando la técnica de aglutinación describieron dos sistemas antigénicos; el sistema Zw, con dos alelos:  $Zw^a$  y  $Zw^b$  y el sistema Ko con dos alelos:  $Ko^a$  y  $Ko^b$ . Moulinier (45) con la técnica de consumo de antiglobulina, describió el Ag DUZO que posee muy poca inmunogenicidad y no se le han descrito alelos. Shulman (46) empleando el método de fijación de complemento estudió dos sistemas antigénicos dialélicos,  $PI^A$  y  $PI^E$ , él encontró el Ac anti  $PI^{A1}$  en el suero de dos pacientes con púrpura post-transfusional con la misma especificidad que anti  $Zw^a$  e identificó los dos alelos de  $PI^E$ :  $PI^{E1}$  y  $PI^{E2}$ . El último Ag reportado fue el denominado  $BaK^a$  por von dem Borne (47), (cuadro 3).



Cuadro 3. Antígenos específicos de plaquetas (35).

Antígeno	Frecuencia Fenotípica	Año de Descubrimiento
DUZO	22%	1957
Zw <sup>a</sup> (P <sub>1</sub> <sup>A1</sup> )	98%	1959
Zw <sup>b</sup> (P <sub>1</sub> <sup>A2</sup> )	27%	1963
Ko <sup>a</sup>	17%	1961
Ko <sup>b</sup>	99%	1965
P <sub>1</sub> <sup>E1</sup>	99.9%	1962
P <sub>1</sub> <sup>E2</sup>	5%	1964
BaK <sup>a</sup>	91%	1980

## 8. SISTEMA HLA

En la década de los cincuentas se describieron por primera vez los Ac leucoaglutinantes encontrados en sueros de pacientes politransfundidos (7), y en sueros de mujeres multigestas (8). Las reacciones usadas para establecer compatibilidad celular y plasmática, revelaron que cuando se ponfa suero de esos pacientes, con leucocitos de diferentes individuos existfan reacciones positivas de aglutinación con unos y negativas con otros (7), evidenciando un reconocimiento celular entre ciertos grupos de individuos. Estos descubrimientos sugirieron que los Ac de los sueros de los pacientes descritos estaban identificando aloantígenos sobre células los cuales eran producto de un locus genético polimórfico.

En experimentos recientes se encontró que éstos Ag se integran en un sistema de defensa inmunológica que protege al cuerpo de sus propias células, cuando se ven infectadas por virus o se vuelven cancerosas. Los Ag de histocompatibilidad como moléculas difieren de unos individuos a otros y se reconocen en el rechazo de injertos. Los estudios sobre estos se hicieron en ratones reportándose en el año de 1937 por Gorer con la ayuda de Snell. En el año de 1950 se reportaron sobre leucocitos humanos y se denominaron Ag HLA (48). El comple-

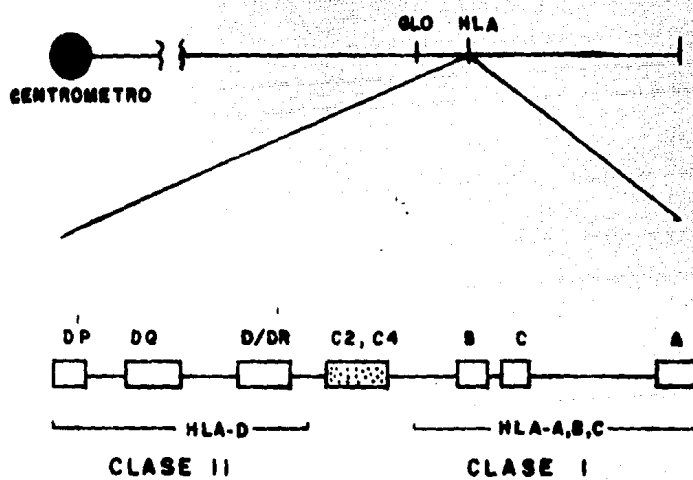


Figura 7. Representación esquemática del sistema HLA en el brazo corto del cromosoma 6 (49).

jo HLA ocupa un segmento de aproximadamente 2 cM en el brazo corto del cromosoma número 6. Existen siete loci genéticos reconocidos que son: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. Entre el locus HLA-B y HLA-D se hallan los genes que codifican para el segundo y cuarto componentes del complejo (figura 7).

En cada locus puede encontrarse una de varias formas alélicas de un gene. Los alelos en cada locus se designan por el nombre del locus y un número, así: HLA-A1 es el alelo 1 en el locus HLA-A. Los alelos que se han asignado a un locus dado pero que no están todavía reconocidos se designan por una letra w (por la palabra inglesa "workshop"). El sistema HLA es polimórfico, esto quiere decir; que existen múltiples alelos diferentes en cada locus (cuadro 4).

Los Ag de clase I denominados también Ag típicos de histocompatibilidad que incluyen a los Ag HLA-A, HLA-B y HLA-C se encuentran en todas las células nucleadas humanas. Estructuralmente es una molécula de dos cadenas: una de ellas constituida por una glucoproteína polimórfica codificada por genes del complejo HLA y una beta<sub>2</sub>-microglobulina codificada por un gen en el cromosoma 6 (figura 8), (49). Los Ag de clase II, se encuentran en la superficie de células inmunocompetentes

Cuadro 4. Nomenclatura de los antígenos del sistema HLA (Pel Freez).

HLA-DP	HLA-DQ	HLA-DR	HLA-D	HLA-B		HLA-C	HLA-A
DPw 1	DQw 1	DR 1	Dw 1	B5	Bw 50(21)	Cw 1	A 1
DPw 2	DQw 2	DR 2	Dw 2	B7	B 51(5)	Cw 2	A 2
DPw 3	DQw 3	DR 3	Dw 3	B8	Bw 52(5)	Cw 3	A 3
DPw 4		DR 4	Dw 4	B12	Bw 53	Cw 4	A 9
DPw 5		DR 5	Dw 5	B13	Bw 54(w22)	Cw 5	A 10
DPw 6		DRw 6	Dw 6	B14	Bw 55(w22)	Cw 6	A 11
		DR 7	Dw 7	B15	Bw 56(w22)	Cw 7	Aw19
		DRw 8	Dw 8	B16	Bw 57(17)	Cw 8	A 23(9)
		DRw 9	Dw 9	B17	Bw 58(17)		A 24(9)
		DRw 10	Dw 10	B18	Bw 59		A 25(10)
		DRw 11(5)	Dw 11(w7)	B21	Bw 60(40)		A 26(10)
		DRw 12(5)	Dw 12	Bw22	Bw 61(40)		A 28
		DRw 13(w6)	Dw 13	B27	Bw 62(15)		A 29(w19)
		DRw 14(w6)	Dw 14	B35	Bw 63(15)		A 30(w19)
			Dw 15	B37	Bw 64(14)		A 31(w19)
			Dw 16	B38(16)	Bw 65(14)		A 32(w19)
			Dw 17(w7)	B39(16)	Bw 67		Aw33(w19)
		DRw 52	Dw 18(w6)	B40	Bw 70		Aw34(10)
		DRw 53	Dw 19(w6)	Bw41	Bw 71(w70)		Aw36
				Bw42	Bw 72(w70)		Aw43
				B44(12)	Bw 73		Aw66(10)
				B45(12)			Aw68(28)
				Bw46			Aw69(28)
				Bw47			
				Bw48	Bw 4		
				B49(21)	Bw 6		

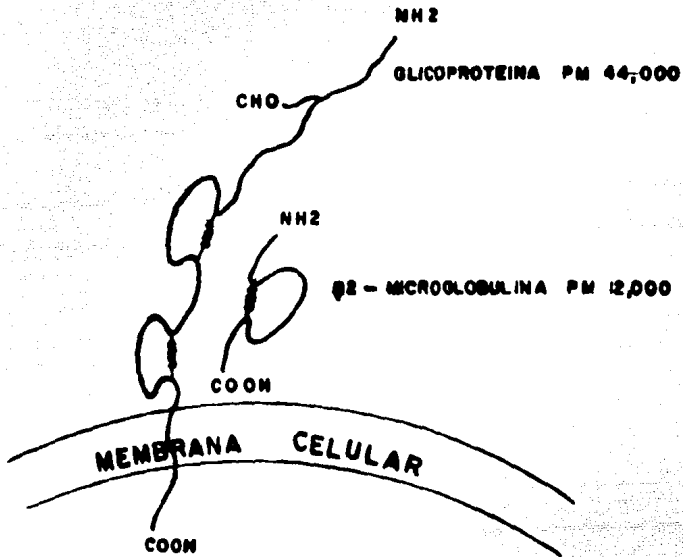


Figura 8. Estructura de los antígenos de clase I (49).

incluyendo macrófagos, monocitos, linfocitos T activados y principalmente en linfocitos B, esta clase está formada por los Ag HLA-D, HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ y se componen de una glucoproteína de doble cadena, una cadena alfa y una beta con diferente peso molecular, unida por enlaces no covalentes (49,50), (figura 9). Parece ser que la función fisiológica de la histocompatibilidad de clase I se relaciona con el fenómeno de restricción de histocompatibilidad para la lisis mediada por células en contra de células infectadas por virus. Los Ag HLA-D/DR son los responsables en la reacción injerto contra huésped, se ha demostrado que estos Ag intervienen en la presentación del Ag por el macrófago al linfocito T, así como en la colaboración eficiente intercelular de células inmunocompetentes e intervienen en la integración de la respuesta inmune en la cooperación celular (49,50).

## 9. ANTICUERPOS

Los Ac son proteínas producidas por las células plasmáticas, como resultado de la introducción de algún Ag y que tienen la capacidad de combinarse con el Ag que la produjo. Estas proteínas circulan en el suero sanguíneo de los vertebrados (51).

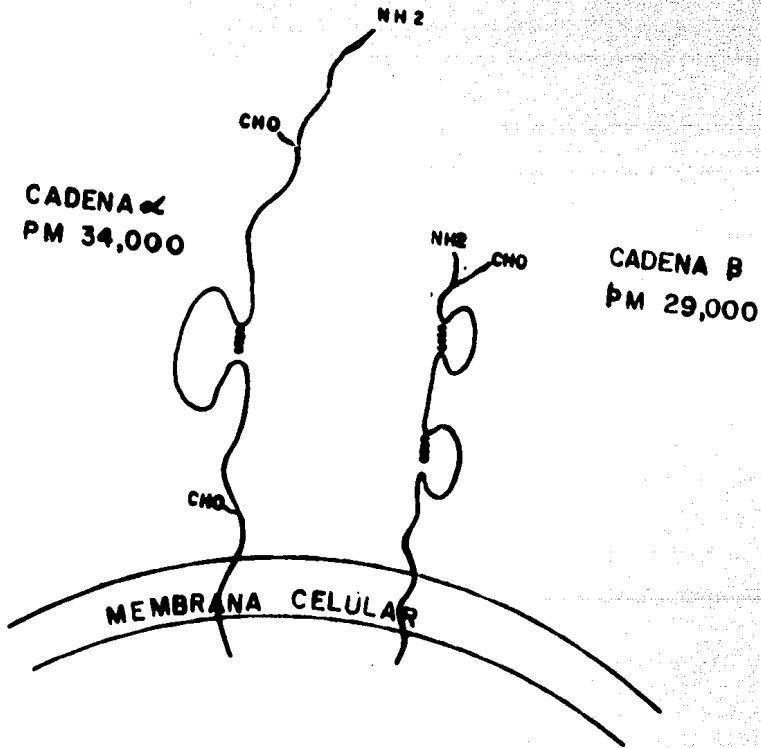



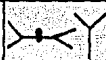



Figura 9. Estructura de los antígenos de clase II (49).

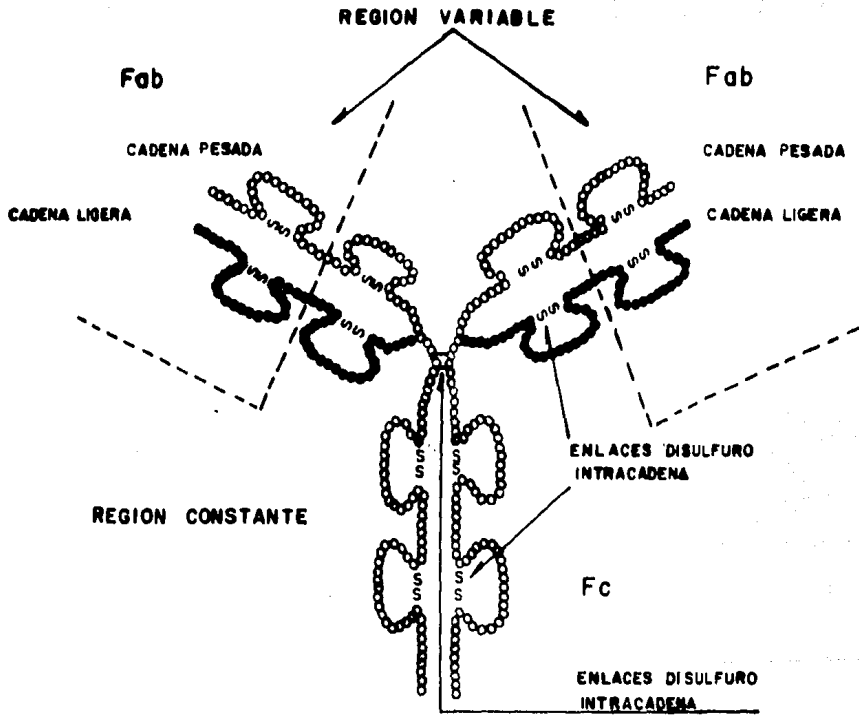


Algunas investigaciones demostraron que los Ac constituyen un grupo de proteínas séricas relacionadas entre sí llamadas inmunoglobulinas, que migran electroforéticamente en la región de las beta y gamma globulinas, son glucoproteínas compuestas de 82 a 92% de polipéptidos y de 4 a 16% de carbohidratos, en donde la porción polipeptídica posee casi todas las propiedades biológicas de la molécula (52) (cuadro 5).

En 1960 fué determinada la estructura básica de los Ac por Porter y Edelman (51). Cada unidad básica de inmunoglobulina está integrada por cuatro cadenas polipeptídicas, dos de éstas denominadas pesadas (H) y las otras dos ligeras (L), las cuatro cadenas se encuentran unidas entre sí por puentes disulfuro intercatenarios, a su vez cada cadena presenta una región variable (53,54), (figura 10).

Al tratar la inmunoglobulina con papaína la molécula se rompe sobre el lado N-terminal de los enlaces disulfuro de la cadena pesada, resultando tres fracciones, de las cuales dos son llamadas fragmentos Fab, que incluyen una cadena ligera completa y los dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$  de una cadena pesada, asociados con la fijación del Ag y un fragmento compuesto de las mitades de C-terminal de las cadenas pesadas llamado Fc. Al tratar con pepsina el rompimiento es sobre el carboxilo terminal

Cuadro 5. Propiedades y funciones biológicas de la inmunoglobulina					
	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Cadenas H	$\gamma$	$\alpha$	$\mu$	$\delta$	$\epsilon$
Subclases de H	$\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$	$\alpha_1, \alpha_2$	$\mu_1, \mu_2$		
Tipo de Cadenas L	$\kappa, \lambda$	$\kappa, \lambda$	$\kappa, \lambda$	$\kappa, \lambda$	$\kappa, \lambda$
Coefficiente de sedimentación (sf)	6-7		19	7-8	8
Peso molecular (daltons)	150,000	160,000 monom.	900,000	180,000	190,000
Movilidad Electroforética	$\gamma$	$\gamma, \beta$	$\gamma, \beta$	$\gamma$	$\gamma$
Fijación de complemento	+	0	++++	0	0
Concentración sérica (mg/dl)	1,000	200	120	3	0.05
Vida media sérica	23	6	5	2-8	1-5
Paso a través de placenta	+	0	0	0	0
Actividad reaginica	?	0	0	0	++++
Lisi antibacteriana	+	+	+++	?	?
Actividad antiviral	+	+++	+	?	?
Estructura					



● AMINOACIDOS EN LAS CADENAS LIGERAS  
 ○ AMINOACIDOS EN LAS CADENAS PESADAS

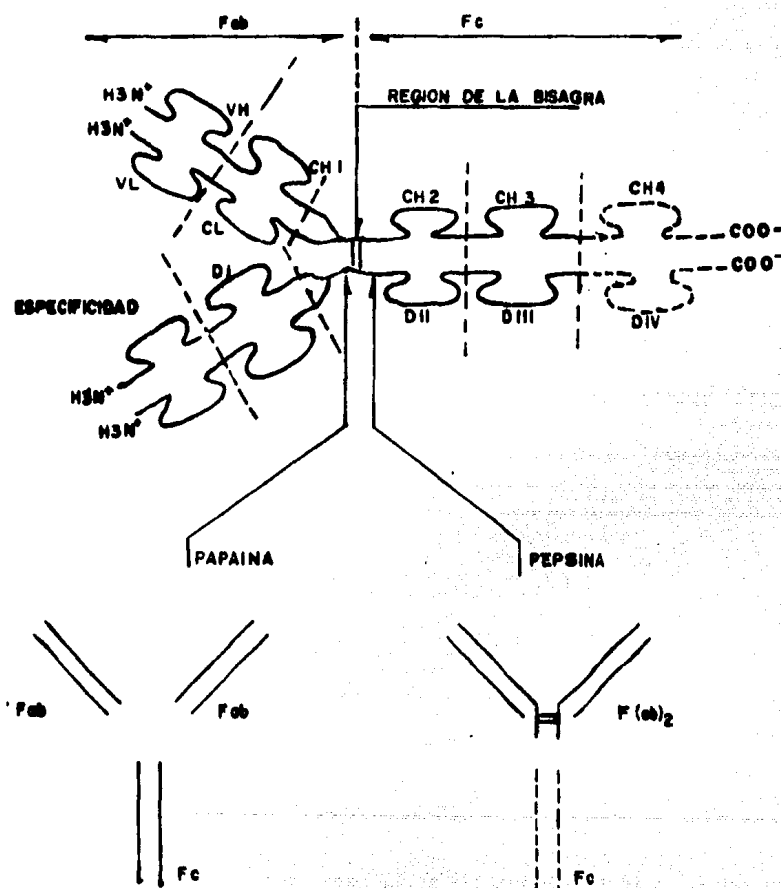
Figura 10. Estructura básica del monómero común de inmunoglobulinas (51).

de los enlaces disulfuro intracadena pesada obteniéndose el fragmento  $F(ab)_2$  compuesto de dos fragmentos Fab y el fragmento Fc se degrada completamente (53), (figura 11).

Los enlaces disulfuro intracadena dividen a las cadenas pesadas y ligeras en varios dominios que se designan como:  $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ,  $C_{H4}$  y  $V_L$ ,  $C_L$  respectivamente. Entre los dominios  $C_{H1}$  y  $C_{H2}$  se encuentra una región formada por prolinas, que le da flexibilidad a la molécula llamada bisagra; ésta región es muy susceptible al ataque proteolítico (54), (figura 11).

La clase de una inmunoglobulina estructuralmente queda definida por la presencia de cualquier cadena pesada de los cinco tipos identificados, por la diferencia en sus regiones constantes; pudiendo ser  $\alpha, \rho, \gamma, \delta, \epsilon$  esto condiciona a las inmunoglobulinas en IgA, IgG, IgD, IgE e IgM respectivamente. La mayoría de las clases de cadenas H han sido subdivididas en subclases con base a diferencias serológicas o fisicoquímicas en las regiones constantes. Se han definido dos tipos de cadenas ligeras que son kappa y lambda y cuatro subtipos de la última (55, 56).

Las inmunoglobulinas pueden estar formadas por monómeros ó polímeros de unidades básicas. La IgG, IgD e IgE son monómeros



Fab = Fragmento de unión al antígeno  
 Fc = Fragmento cristalizabile  
 Vh = Variable pesado  
 CH1 = Constante pesado 1  
 CH2 = Constante pesado 2  
 CH3 = Constante pesado 3  
 VL = Variable ligero  
 CL = Constante ligero  
 H<sub>3</sub>N<sup>+</sup> = Amino terminal  
 COO<sup>-</sup> = Carboxilio terminal  
 DI, DII, DIII y DIV = Dominios

Figura 11. Componentes estructurales de las inmunoglobulinas (49).

La IgA en suero es monómero o polímero, en secreciones es un dímero; la IgM está formada por cinco subunidades. Las inmunoglobulinas poliméricas poseen una cadena polipeptídica llamada cadena J\*. Las moléculas de IgA en secreciones poseen otro polipéptido adicional llamado componente secretorio (SC) (53, 54).

#### 10. ANTICUERPOS ANTIPLAQUETAS

Debido al incremento de la terapia transfusional en pacientes que han padecido cierta pérdida de la hemostasia, se hace necesario el suministro repetido de sangre o sus componentes, como esto representa la presencia de sustancias extrañas al individuo, el sistema inmune de dichos individuos origina una serie de respuestas, con peligro de la creación de Ac. Los elementos sanguíneos como leucocitos y plaquetas poseen Ag que les son comunes (Ag del sistema HLA), no obstante en las plaquetas se han observado Ag que son propios de ellas con una especificidad bien marcada e induciendo también el desarrollo de Ac.

Algunos investigadores demostraron que estos AcAP son principalmente de tipo IgG, que fijan complemento y que son capaces de atravesar la barrera placentaria produciendo así trombocitopenia en el recién nacido (57). Se han detectado las

\* Join: enlazar

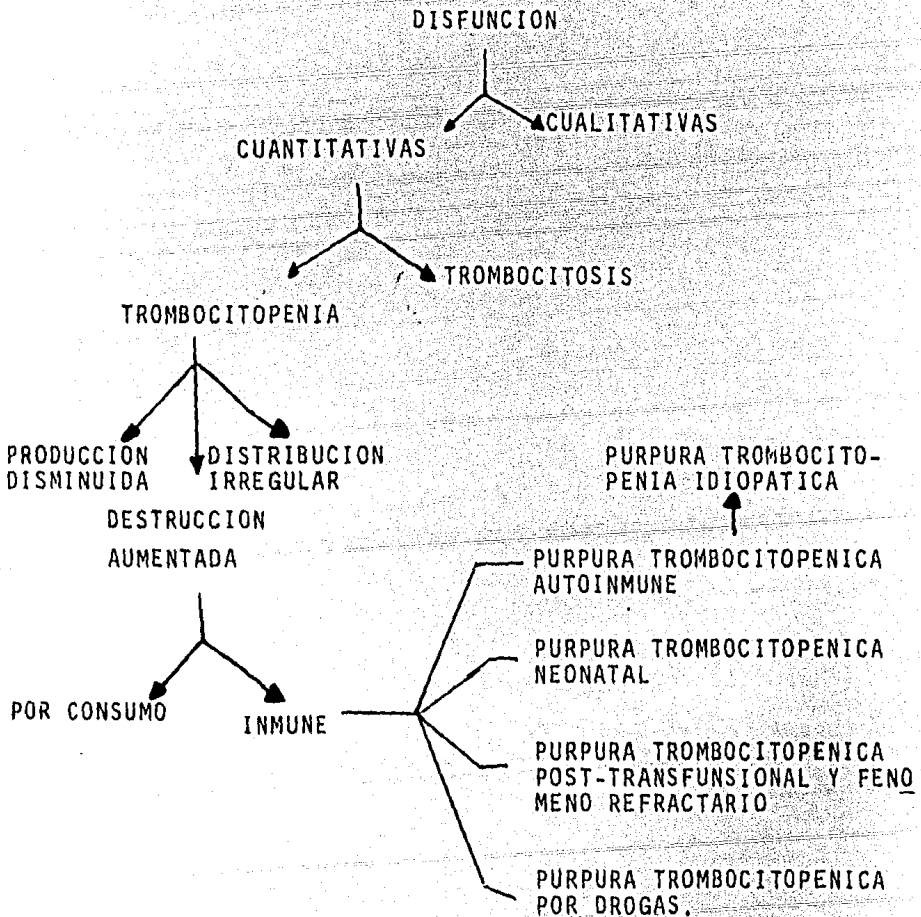
cuatro subclases de IgG sobre la membrana plaquetaria con mayor proporción la IgG1 (58).

## 11. PATOLOGIA ASOCIADA A ANTICUERPOS ANTIPLAQUETAS

El término trombocito es sinónimo de plaqueta y la palabra trombocitopenia define la disminución de la cuenta plaquetaria normal. Las trombocitopenias pueden ser causadas por una disminución en la producción de plaquetas, o un incremento en su destrucción o por amontonamiento en el bazo hiperesplénico (59), (cuadro 6 ).

En la destrucción incrementada la trombocitopenia puede desarrollarse a partir de un consumo anormal de plaquetas o por un mecanismo inmune mediado por Ac, esta última es por fagocitosis de plaquetas sensibilizadas con IgG, complejos inmunes o complemento (figura 12), en el sistema retículo endotelial (60). La destrucción inmune se relaciona con la aparición de autoanticuerpos, aloanticuerpos o procesos inmunes inducidos por droga. La destrucción auto inmune puede presentarse subyacente a complicaciones de otras enfermedades tales como lupus eritematoso, leucemia linfocítica crónica, linfoma maligno o enfermedades virales. Cuando se desconoce el origen del padecimiento se le denomina púrpura trombocitopénica idiopática

Cuadro 6. Clasificación de los trastornos asociados a plaquetas (17).





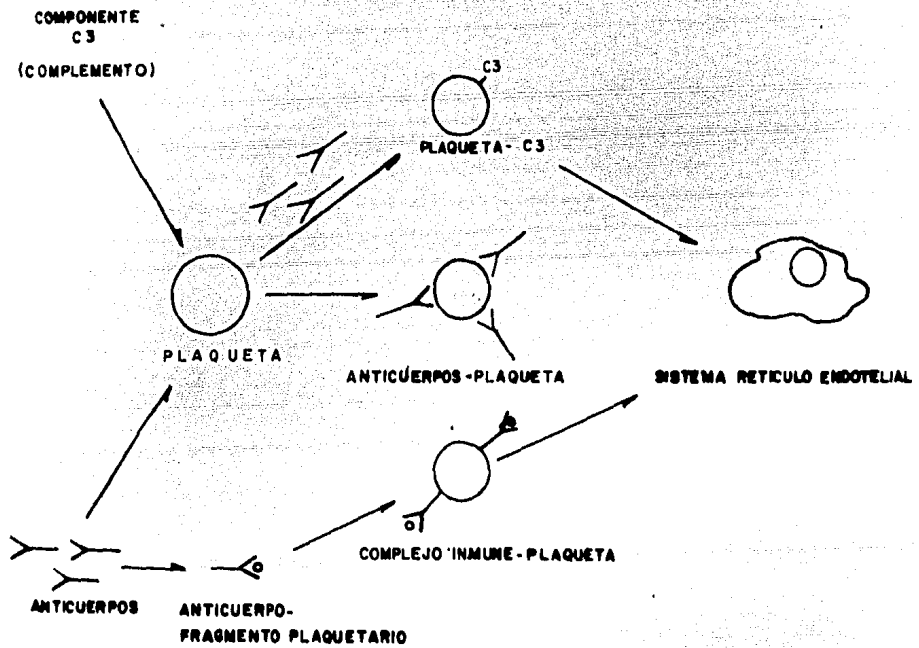


Figura 12. Mecanismo de destrucción inmune extravascular de plaquetas (57).

ca (59). Los aloanticuerpos aparecen, por lo general, después de múltiples transfusiones o embarazos y en algunos recién nacidos por paso de Ac de la madre a través de placenta y en este caso se le llama púrpura trombocitopenica neonatal (61). La destrucción plaquetaria inducida por drogas, ocurre como resultado de la combinación de complejos Ac-droga con la plaqueta (62) o un complejo droga-plaqueta que reacciona con el Ac anti-droga.

La destrucción de plaquetas por mecanismos inmunes ha sido demostrada en numerosos estudios, entre estos están los experimentos clásicos de Shulman (46), en ellos se transfundieron isoanticuerpos anti PL<sup>A1</sup> y anti PL<sup>E1</sup> y Ac contra drogas de individuos con púrpura trombocitopénica autoinmune a receptores sanos, provocando una disminución en la cuenta de plaquetas. Las plaquetas poco sensibilizadas con capturadas y destruidas por células retículo endoteliales del bazo y las altamente sensibilizadas son eliminadas por hígado (60,63,64). El complemento juega un papel importante en la destrucción inmune de plaquetas. Hauch y Rosse (65) detectaron aproximadamente 11000 moléculas del componente C<sub>3</sub> del complemento y 15000 de IgG sobre plaquetas normales, esto activa la adhesión de la plaqueta al macrófago propiciando su destrucción en condiciones patológicas.

## 12. PURPURA POST-TRANSFUSIONAL

La púrpura post-transfusional (PPT) es un síndrome que consiste en la destrucción de plaquetas, causada por aloanticuerpos antiplaquetas del receptor después de una transfusión de sangre. Van Loghem (43) y Zucker (66) fueron los primeros en describir pacientes PPT con aloanticuerpos antiplaquetas y trombocitopenia. Shulman (46) asoció la presencia de aloanticuerpos con trombocitopenia describiendo el origen de la PPT al estudiar este síndrome en un paciente transfundido con sangre que contenía el Ag  $P_1^{A1}$  plaquetario. Shulman postuló que un paciente  $p_1^{A1}$  negativo que ha recibido sangre  $P_1^{A1}$  positiva produce Ac anti  $P_1^{A1}$ , los cuales causan destrucción de plaquetas, tanto de plaquetas que presentan el Ag  $P_1^{A1}$  como aquellas que no lo tienen. La exposición de un individuo  $P_1^{A1}$  negativo a sangre  $P_1^{A1}$  positiva es cercana al 99%, pero el síndrome no es frecuentemente observado. La PPT se caracteriza por una severa trombocitopenia que ocurre de 7 a 10 días después de una transfusión. La transfusión puede estar acompañada por escalofrío y fiebre característica de una reacción contra estas células. La trombocitopenia es generalmente limitada y puede durar de 2 a 6 semanas, ocasionalmente persiste por meses. Casi todos los casos descritos han sido en pacientes previamente sensibilizados con sangre  $P_1^{A1}$  positiva por transfusiones o embarazos (60).

### 13. FENOMENO REFRACTARIO

En un paciente que por diferentes causas pierde la función plaquetaria, es necesario hacerle transfusiones de estas células, al realizar repetidamente este proceso el paciente puede desarrollar un fenómeno refractario a esta terapia, que consiste en no recobrar la función plaquetaria esperada. Este síndrome también puede presentarse en individuos que reciben transfusiones múltiples de paquetes globulares (42).

El mecanismo que explica este padecimiento es la respuesta inmune con la producción de AcAP contra Ag específicos de la plaqueta o contra Ag del sistema HLA de clase I, por lo que es necesaria la hemoterapia con plaquetas compatibles, lo cual es muy complicado y sumamente costoso ya que se requiere de la obtención de muestrarios de plaquetas con fenotipos HLA conocidos para realizar la transfusión de plaquetas compatibles por HLA que generalmente se encuentran dentro del núcleo familiar del enfermo (36).

En México la frecuencia de Ac generados por transfusiones en contra de Ag específicos de plaquetas es del 7.6% (66) y la de Ac anti-HLA del 24.7% (67).

#### 14. CARACTERISTICAS METODOLOGICAS PARA ESTUDIAR ANTICUERPOS ANTI-PLAQUETAS.

Los métodos empleados para el estudio de los Ac antieritrocitos y antileucocitos fueron usados como base para la detección de AcAP. A partir de estos estudios se han desarrollado procedimientos inmunológicos más específicos tendientes a encontrar técnicas que sean lo suficientemente adecuadas para cada tipo de Ac que se necesite estudiar con características metodológicas de sencillez, confiabilidad y aplicabilidad en cualquier laboratorio de banco de sangre (cuadro 7).

En la presente tesis se eligió la técnica de inhibición de la migración de plaquetas para la detección de Ac antiplaquetas en pacientes politransfundidos por ser aparentemente un método simple y con una mayor sensibilidad que otros métodos como lisis de plaquetas, fijación de complemento, agregometría plaquetaria y liberación de factor-3-plaquetario (69,70). El método de linfocitotoxicidad se seleccionó como referencia para comparar los resultados obtenidos por IMP, por ser de mayor confiabilidad entre los métodos probados en el laboratorio del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social,

Cuadro 7. Características de los métodos utilizados para el estudio de anticuerpo antiplaquetas.

Método	Fundamento	Interpretación de resultados	Desventajas
Aglutinación (43)	Formación de aglutinado debido a la presencia de anticuerpos aglutinantes.	La observación microscópica del botón de aglutinación.	Insensible Falsas positivas
Consumo de antiglobulina (45)	La antiglobulina se une a la fracción Fc del AcAP fijado a la plaqueta, impide la aglutinación eficiente de los eritrocitos recubiertos con anticuerpo anti-D, que sirve como indicador de reacción.	Estimación del suero de antiglobulina residual por medio de la observación microscópica del botón de aglutinación en el sistema indicador	Falsas positivas
Fijación de complemento (71)	El complemento se une a los AcAP fijados a la plaqueta impidiendo hemólisis de eritrocitos de carnero recubiertos con hemolisina que se agregan como indicador de consumo de complemento.	Observación microscópica de hemólisis y/o células intactas en el sistema indicador.	Estandarización de reactivos complicada.

Método	Fundamento	Interpretación de resultados	Desventajas
Fluorocromasia (72)	El complemento se une a los AcAP fijados a la plaqueta provocando su lisis y salida de un colorante fluorescente (C-FDA), previamente añadido.	Observación microscópica de fluorescencia en las plaquetas.	Requiere de microscopio invertido de fluorescencia.
LIBERACION DE FACTOR-3 PLAQUETARIO (73)	La unión de AcAP a la plaqueta produce una liberación del factor-3 plaquetario, el cual acelera la formación del coágulo.	Tiempo de formación del coágulo visual o fibrométricamente.	Difícil estandarización, poca reproducibilidad y sensibilidad.
LIBERACION DE SEROTONINA (74)	Las plaquetas incorporan y almacenan serotonina, la cual es liberada cuando se adhieren Ac a la plaqueta. La liberación de serotonina se mide marcando ésta con $^3\text{H}$ o $^{14}\text{C}$ .	Cuantificación de radioactividad del sobrenadante.	Usa material radioactivo, algunas drogas causan liberación de serotonina de las plaquetas. Poca correlación con linfocitotoxicidad.

Método	Fundamento	Interpretación de resultados	Desventajas
INHIBICION DE LA INCORPORACION DE SEROTONINA (74)	La incorporación de serotonina a la plaqueta se inhibe por la presencia de anticuerpos en la membrana de ésta. La serotonina es marcada con $^{14}\text{C}$ para determinarla en el sobrenadante.	Cuantificación de radioactividad del sobrenadante.	Utiliza material radioactivo.
LIBERACION DE ADENINA (75)	La adenina se libera de la plaqueta debido a la unión de ésta con el AcAP. Esta liberación se mide marcando a la adenina con $^3\text{H}$ .	Cuantificación de radioactividad en el sobrenadante.	Utilización material radioactivo.
Liberación de $^{51}\text{Cr}$ (76)	El complemento se une a los AcAP que se han fijado a la plaqueta previamente marcada con $^{51}\text{Cr}$ provocando la lisis de éstas. Puede utilizar plaquetas de pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna por su sensibilidad a complemento.	Cuantificación de radioactividad en el sobrenadante.	Utiliza material radioactivo. Falsas positivas por lisis espontánea.



Método	Fundamento	Interpretación de resultados	Desventajas
Agregometría plaquetaria (77)	Las plaquetas se agregan espontáneamente en presencia de AcAP produciendo un cambio de densidad óptica.	Medición de un cambio en densidad óptica.	Requiere de un agregómetro. Insensibilidad.
INMUNOFLUORESCENCIA (78)	La antiglobulina marcada con fluoresceína se pega al AcAP fijado a la plaqueta.	Observación microscópica de fluorescencia celular.	Requiere de material y equipo costoso.
ENZIMÁTICO (79)	La antiglobulina marcada con una enzima (fosfatasa alcalina o peroxidasa) se pega al anticuerpo fijado en la plaqueta. El sustrato de la enzima se agrega a las plaquetas, si éstas tienen la enzima se observará un cambio de color.	Medición de cambio de color espectrofotométricamente.	Reactivos de alto costo. Espectrofotómetro
RADIOINMUNOENSAYO (80)	La antiglobulina marcada con $^{125}\text{I}$ se pega al AcAP fijado en la plaqueta.	Cuantificación de radioactividad en las plaquetas.	Utiliza material radioactivo.

Método	Fundamento	Interpretación de resultados	Desventajas
PROTEINA A DE ESTAFILOCOCO (81)	La proteína-A del estafilococo tiene afinidad específica por la fracción Fc de la IgG. Esta proteína es marcada con $^{125}\text{I}$ y se agrega a las plaquetas previamente incubadas con el suero problema.	Cuantificación de radioactividad en las plaquetas.	Utiliza material radioactivo.
Fab-anti Fab (82)	El anticuerpo anti-Fab se une a la porción Fab del AcAP pegado a la plaqueta, para saber si anti-Fab se ha unido a la plaqueta, se adicionan fragmentos Fab de inmunoglobulina humana radiomarcada al sobrenadante, los complejos Fab-antiFab que se formen en éste se precipitan con sulfato de amonio al 50%.	Cuantificación de radioactividad en el precipitado.	Estandarización de reactivos complicada. Utilización de material radioactivo.

Método	Fundamento	Interpretación de resultados	Desventajas
<p>CUENTAS RECUBIERTAS CON anti IgG (B3)</p>	<p>Las plaquetas que presentan AcAP adheridos en su superficie forman rosetas con cuentas de poliacrilamida recubiertas con antioglobulina al reaccionar ésta con los anticuerpos antiplaquetarios.</p>	<p>Cuenta microscópica de rosetas.</p>	<p>Método laborioso.</p>

## 15. METODO PROPUESTO: INHIBICION DE LA MIGRACION DE PLAQUETAS (IMP)

Se sabe que las plaquetas empacadas en tubos capilares son capaces de migrar en ellos (84), esta migración es un fenómeno biológico y no el resultado de un movimiento browniano o de difusión, los experimentos que comprobaron esta aseveración demostraron también que la migración de plaquetas es directa al colágeno cuando éste es añadido (85). Estas observaciones ponen de relieve dos funciones de la plaqueta: motilidad y quimiotaxis. Otras propiedades contráctiles de las plaquetas como cambio de forma, emisión de pseudópodos y reacción de liberación han sido atribuidas a la protefna contráctil llamada trombostenina. Sugiriendose que dicha protefna puede participar también en la motilidad de muchos tipos de células por interacción con protefnas contráctiles, esto se probó con plaquetas, observándose una inhibición significativa de la migración de las plaquetas al colágeno. Valone (86) reportó que durante sus estudios de migración aleatoria de leucocitos, observó que las plaquetas tenían también movimiento a través de filtro millipore.

Duquesnoy (69) describe una técnica para la detección de AcAP dirigidos contra Ag específicos de plaquetas y Ag HLA. Este método utiliza una mezcla de plasma rico en plaquetas de dona

dores que se incuban a temperatura ambiente con el suero problema después de hacer diluciones de éste, se colocan en tubos capilares y se centrifuga para obtener un botón, el capilar se corta al nivel del botón y se deposita en una cámara de migración de Bloom, la cual contendrá medio de cultivo de Hanks y durante 12 a 18 horas se incuban a temperatura ambiente, procediéndose a continuación a medir el halo de migración de las plaquetas. La inhibición de la migración es proporcional a la cantidad de AcAP presentes en el suero del paciente. Maples (70) hizo una modificación utilizando caja de petri con agarosa al 2% en lugar de cámara de Bloom.

## 16. METODO DE REFERENCIA: LINFOCITOTOXICIDAD.

El empleo de este método como alternativa para la detección de AcAP, se basa en que los Ac antileucocitos están dirigidos contra Ag HLA clase I, que son compartidos por leucocitos y plaquetas como se describe en el cuadro 8:

El método se basa en la capacidad que tiene el complemento de conejo para dañar linfocitos recubiertos con Ac después de una reacción Ag-Ac (87).

Los Ac antileucocitos se pueden demostrar en el suero de pacientes, poniendo a reaccionar éste con un muestrario (panel) de linfocitos de diez donadores sanos diferentes en presencia de complemento. Si el suero problema contiene Ac antileucocitos éstos se unirán al linfocito que posea en su superficie el Ag que provocó la formación del Ac específico, activando así la cascada de complemento para finalmente producir la muerte celular.

Cuadro 8. Distribución de antígenos sobre la membrana en las diferentes células sanguíneas.

ANTIGENOS CELULARES	ERITROCITOS	LINFOCITOS B	LINFOCITOS T	MONOCITOS	PLAQUETAS
ABO	Si	Si	Si	Si	Si
Rh-Hr	Si	No	No	No	No
HLA clase I	No	Si	Si	Si	Si
HLA clase II	No	Si	en LT "activados"	Si	No

### III. OBJETIVOS

En diversas condiciones patológicas se precisa de la terapia transfusional y al hacerlos repetidamente con sangre completa o concentrados plaquetarios, algunos pacientes tienden a desarrollar AcAP, de tal manera que para recibir una nueva transfusión es necesario conocer la presencia de éstos, para tal motivo se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.- Caracterizar el patrón de comportamiento de los AcAP con las técnicas de inhibición de la migración de plaquetas y como referencia la de linfocitotoxicidad, en pacientes politransfundidos que presentan patologías diversas.
- 2.- Adaptar la técnica de inhibición de la migración de plaquetas a los recursos del Banco Central de Sangre del Centro Médico del I.M.S.S.
- 3.- Relacionar la frecuencia de identificación de los AcAP, con las patologías que presentan los pacientes.
- 4.- Corroborar la identificación de los AcAP de la técnica propuesta (IMP) con la de referencia (LCT).
- 5.- Aplicar las pruebas metodológicas para valorar la bondad del método.



#### IV. MATERIAL Y METODOS

##### 1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para caracterizar la presencia de AcAP en pacientes politransfundidos y establecer el patrón de positividad en las diferentes patologías que pudieran presentarse, se estudiaron los sueros de pacientes que provenían de los hospitales ubicados en el Centro Médico Nacional del IMSS; estos pacientes tenían antecedentes de politransfusión y se agruparon en cinco tipos de patologías; padecimientos mieloproliferativos, neoplasias, con probable defecto inmunológico, inmunohematológicos y hemopatías, a su vez estas patologías se agruparon en padecimientos específicos, como se muestra en el (cuadro 9).

De los pacientes estudiados 48 fueron mujeres con edades entre 19 a 74 años y 8 hombres de 18 a 67 años y sus muestras sanguíneas fueron recibidas para el presente estudio en el Banco Central de Sangre del CMN.

##### PREPARACION DE SOLUCIONES

Solución de Hanks 10X

Solución de sales: A una solución acuosa que contenga 160 g

Cuadro 9. Patologías y padecimientos encontrados en los pacientes estudiados.

<u>PATOLOGIA</u>	<u>PADECIMIENTO</u>
PADECIMIENTOS MIELOPROLIFERATIVOS	MIELOMA MULTIPLE LEUCEMIA MIELOBLASTICA AGUDA LEUCEMIA LINFOBLASTICA CRONICA
NEOPLASIAS	CANCER DE VEJIGA CANCER CERVICOUTERINO CANCER DE MAMA ADENOCARCINOMA DEL RECTO CORIOCARCINOMA DEL RECTO
ENTIDADES CON PROBABLE DEFECTO INMUNOLOGICO	GLOMERULONEFRITIS INSUFICIENCIA RENAL CRONICA ESTENOSIS MITRAL PURA CARDIOPATIA REUMATICA CIRROSIS
INMUNOHEMATOLOGICOS	ISOINMUNIZACION MATERNO-FETAL
HEMOPATIAS	HIPOPLASIA DE MEDULA OSEA HEMOGLOBINURIA PAROXISTICA NOCTURNA
SIN IDENTIFICAR	CARENTE DE DATOS

de cloruro de sodio, 8g de cloruro de potasio, 4g de sulfato de magnesio heptahidratado en 100 mL de agua destilada; se le agregó la solución de 2.8g de cloruro de calcio disuelto en 100 mL de agua destilada, la mezcla se aforó a 1000 mL y se preservó con 2 mL de cloroformo. La solución ya preparada se almacenó a 4°C.

Solución de fosfatos: Se disolvieron 3g de fosfato de sodio dodecahidratado, 1g de fosfato de potasio monobásico, 20g de glucosa en 800 mL de agua destilada, se añadieron 100 mL de solución acuosa de rojo de fenol al 0.2% y se aforó a 1000 mL con agua destilada conservando con 2 mL de cloroformo. La solución así preparada se almacenó a 4°C.

La solución de Hanks 10X se preparó mezclando volúmenes iguales de la solución de sales y la solución de fosfatos.

#### Solución de Hanks 4X

A 4 volúmenes de solución de Hanks 10X se le añadieron 6 volúmenes de agua destilada.

#### Solución de Hanks 1X

A 1 volumen de solución de Hanks 10X se le añadieron 9 volúmenes de agua destilada.

#### Solución de Hanks modificada para IMP

Se mezclaron 100 mL de solución de Hanks 10X con 100 mL de citrato de sodio al 20%, 20000 unidades de penicilina G cristalina y 2 mg de estreptomocina disueltas en 100 mL de agua, se aforó a 1000 mL y se agregaron 100 mL de suero fetal de ternera inactivado a 56°C durante 60 minutos. Una vez preparada la solución se esterilizó por filtración y se conservó a 4°C durante 4 semanas.

#### Solución de formol PH 7.0

A 100 mL de formol se le agregaron pequeñas cantidades de una solución de fosfato de sodio dibásico 0.15M, hasta la obtención de un pH de 7.0.

#### Solución de ficoll-hypaque, densidad 1.077 g/cm<sup>3</sup>

Solución de ficoll: A 24 ml de agua destilada se le agregaron 1.92 g de ficoll y sin mezclar se dejó en reposo hasta su disolución completa.

Solución de hypaque al 33.4%: Se diluyeron 6.56 ml de hypaque al 50% en 3.44 mL de agua destilada.

Se mezclaron las dos soluciones anteriores y se midió su densidad. Se guardó en alícuotas de 2 mL en tubos de 13 x 100 y se congeló a -20°C.

### 3. INHIBICION DE LA MIGRACION DE PLAQUETAS

#### a. Fundamento

Las plaquetas por si mismas tienen la capacidad de migrar a través de capilares formando un halo de migración, ésta capacidad es inhibida por la presencia de anticuerpos antiplaquetas.

#### b. Material

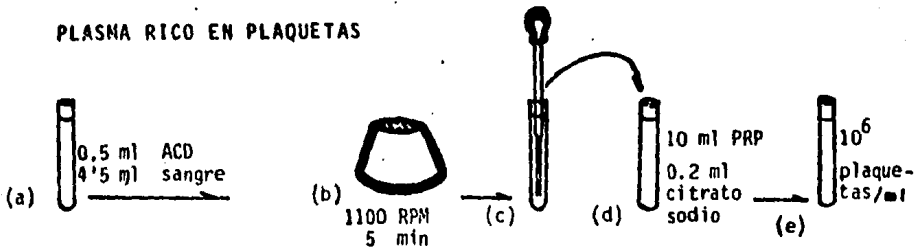
Se empleó material de vidrio siliconizado y estéril, así como equipo, material de curación y de toma de muestras de uso común en laboratorio de análisis clínicos y bancos de sangre.

#### c. Procedimientos

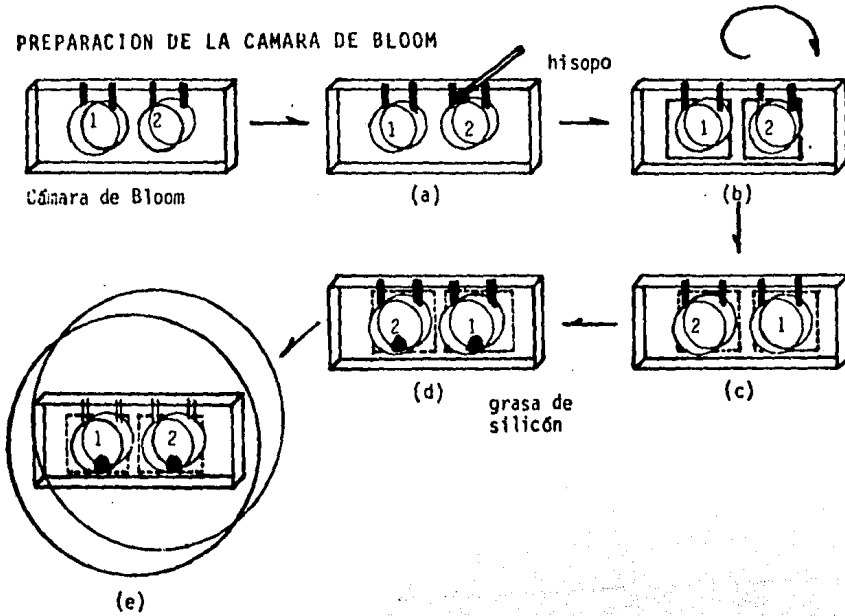
##### Mezcla de plasma rico en plaquetas (PRP)

Se tomaron 4.5 mL de sangre de 10 donadores normales, varones de grupo sanguíneo O positivo, sin antecedentes transfusionales, cada uno en un tubo de vidrio de 12 X 75 mm, siliconizado y estéril, con 0.5 mL de ACD (Ac. cítrico 0.8%, citrato trisódico 2.2%, dextrosa 2.45%) como anticoagulante (figura 13a). Se centrifugaron a 1100 RPM ( $r=13$ ) durante 5 minutos (figura 13b). El PRP se separó por extracción con una pipeta pasteur de vidrio, siliconizada y estéril, mezclando las muestras y se agregaron 0.2 mL de citrato de sodio al 20%

### PLASMA RICO EN PLAQUETAS



### PREPARACION DE LA CAMARA DE BLOOM



Figuras 13 y 14. Preparación de plasma rico en plaquetas y cámara de Bloom.

por cada 10 mL de PRP obtenido (figura 13c y d). La mezcla de PRP se ajustó a una concentración de  $10^6$  plaquetas por  $\text{mm}^3$  y se dejó en reposo durante 60 minutos a temperatura ambiente (figura 13e)

#### Preparación de la cámara de Bloom.

Se calentaron aprox. 10g de parafina en un recipiente hasta fundir completamente, con la ayuda de un hisopo se cubrió con parafina la periferia de los pozos 1 y 2 de la parte anterior de la cámara de Bloom (figura 14a). Se esperó a que la parafina solidificara y se tomó con unas pinzas un cubreobjetos precalentado a la flama y fue colocado sobre la parafina de tal manera que quedara completamente cubierto el pozo y se sellaron los cuatro lados del cubreobjeto con parafina (figura 14b). Se hizo lo mismo con el segundo pozo. La cámara se giró y se colocó dentro de cada uno de los pozos 2 y 1 una gota de grasa de silicón de modo que quedara sobre la pared del cubreobjetos y en la base de la cámara (figura 14c y d). Enseguida se procedió a cubrir con parafina la orilla expuesta de los pozos de la cámara. La cámara de Bloom ya preparada fue colocada dentro de una caja de petri estéril hasta su uso (figura 14e).

#### Desarrollo del método de inhibición de la migración de plaque

tas. Duquesnoy (69,70) modificado.

En tubos de 12 X 75 mm de vidrio siliconizados y estériles cubiertos con tapón de hule del No. 00, se colocaron 0.2 mL del suero en estudio descomplementado a 56°C durante 30 minutos, con la dilución (en albúmina al 7% en SSF) correspondiente, se agregaron a cada tubo 0.3 mL de PRP ajustado a  $10^6$  plaquetas por  $\text{mm}^3$  y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente (figuras 15a y c). Después de la incubación se tomó el contenido del primer tubo con pipeta pasteur siliconizada, estéril y previamente enjuagada con albúmina humana al 7%, se limpió la punta de la pipeta con una torunda conteniendo un poco de alcohol y se selló el extremo de la pipeta a la flama de un mechero (figuras 15c y d). Se sujetó la pipeta a un tubo de vidrio de 13 X 100 mm con una tira de cinta adhesiva cuidando que la punta de la pipeta no tocara el fondo del tubo (figura 15e). Se repitieron los pasos anteriores con cada uno de los tubos restantes. Se centrifugaron los tubos conteniendo las pipetas a 2300 RPM\* durante 7 minutos en una centrifuga clínica mod. PR 6000 marca International (figura 15f). Se retiraron cada una de las pipetas ya centrifugadas y se les limpió la punta con una torunda humedecida en un poco de alcohol y se marcó con una segueta la línea de interfase formada entre el botón plaquetario y el plasma (figura 15g); se cortó el capilar de la pipeta con la ayuda de unas pinzas y

\* (r=13).



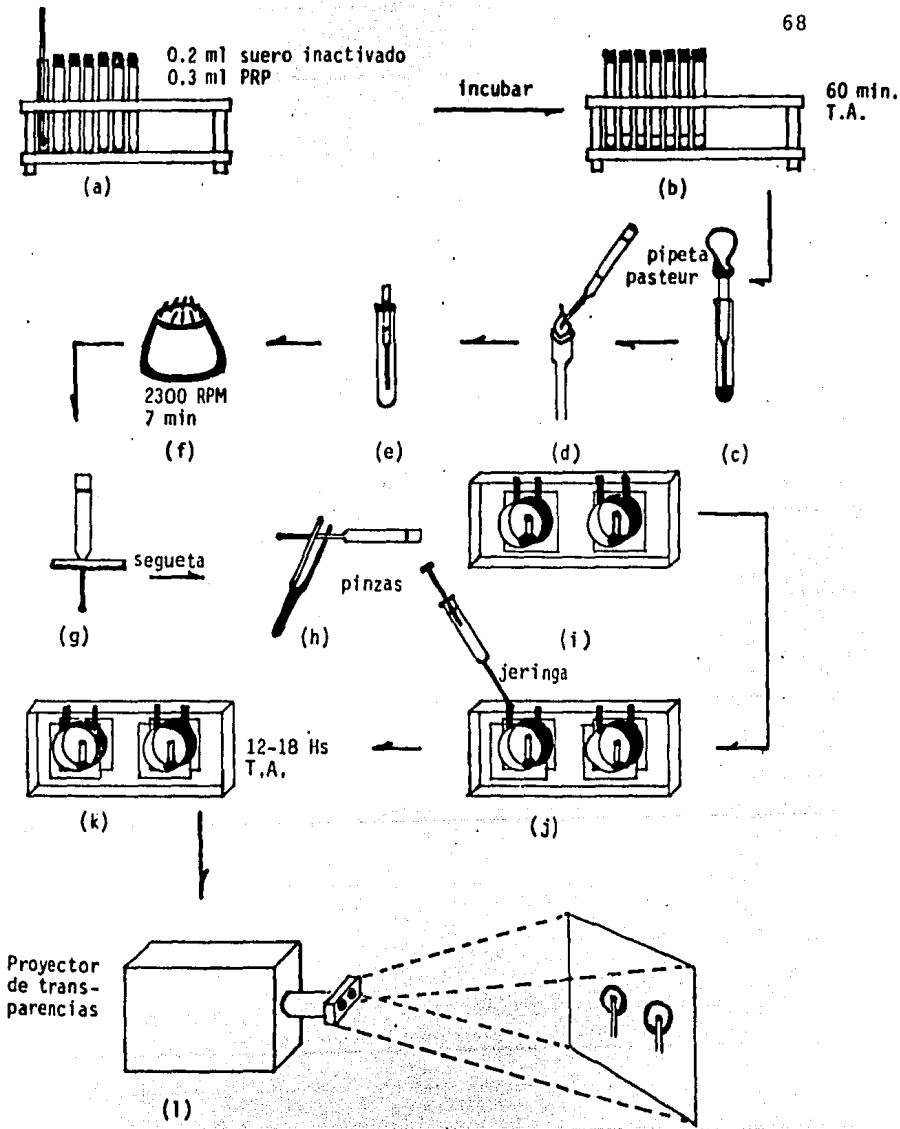


Figura 15. Método de inhibición de la migración de plaquetas

se insertó dentro de la cámara de Bloom previamente preparada (figura 15h), fijándolo en el silicón y recargándolo sobre el cubreobjetos de la cámara (figura 15i). El pozo se cubrió con un cubreobjetos caliente sellando sus cuatro lados con parafina caliente. Se llenó la cámara de Bloom con solución de Hanks modificada para IMP (ver soluciones) a través de los orificios señalados empleando una jeringa de 5 mL, evitando la formación de burbujas en el interior de la cámara, para no contaminarla y se sellaron los orificios con parafina para evitar la salida del medio de difusión (figura 15j). La cámara se incubó por un lapso de 12 a 18 horas a temperatura ambiente y pasado este tiempo se colocó en un proyector de transparencias para dibujar la proyección de los halos de migración sobre papel blanco (figuras 15k y l). Se recortaron los halos y se pesaron en una balanza analítica. Los cálculos se realizaron con la siguiente fórmula:

$$\frac{100 - \text{peso del problema}}{\text{peso del testigo negativo}} \times 100 = \% \text{ de IMP}$$

#### d. Interpretación de resultados

Buscando darle una mayor claridad a la interpretación del resultado de la técnica de IMP, se representaron éstos según el título de positividad, relacionándolo con la puntuación según la reactividad, la cual se estimó de acuerdo con la intensi-

dad de la reacción (cuadro 10).

Cuadro 10. Interpretación de resultados para IMP

% DE IMP	POSITIVIDAD EN CRUCES	CRIR
0 %	-	0 puntos
1-25%	+	5 puntos
26-50%	++	8 puntos
51-75%	+++	10 puntos
76-100%	++++	12 puntos

CRIR = calificación relativa de la intensidad de la reacción.

Ejemplo:

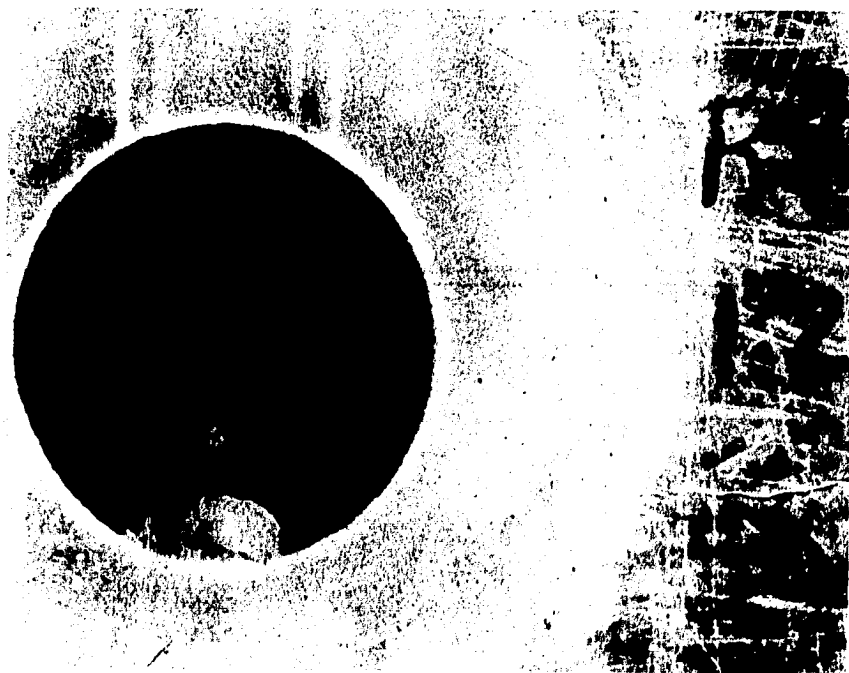
Título de IMP \ Muestra	SP	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
Suero 1	100%	73%	42%	26%	8%	0%
Suero 2	97%	86%	73%	52%	25%	0%

En los dos casos anteriores el título de IMP sería de 1/16, pero se observaron diferencias entre los dos sueros en cuanto a los porcentajes de IMP obtenidos en cada dilución por lo que se decidió manejar los porcentajes en cruces de positividad y a su vez se le asignó una puntuación a cada una de éstas como se hace en la aglutinación de eritrocitos en Banco de Sangre, obteniéndose así la calificación relativa de la intensidad de la reacción en cada una de las muestras sumando los puntos ob

## INHIBICION DE LA MIGRACION DE PLAQUETAS



Testigo negativo: 0% de IMP



Suero del paciente R.V. diluido 1:2 con 92% de IMP



Suero de paciente R.V. diluido 1:4, con 57% de IMP



Suero del paciente R.V. diluido 1:8, con 0% de IMP

tenidos en cada dilución.

Suero 1. CRIR = 43							
Dilución	SP	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	
Positividad en cruces	++++	+++	++	++	+	-	
CRIR	12	10	8	8	5	0	suma 43

Suero 2. CRIR = 52

Dilución	SP	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	
Positividad en cruces	++++	++++	+++	+++	++	-	
CRIR	12	12	10	10	8	0	suma 52

#### 4. LINFOCITOTOXICIDAD (LCT)

##### a. Fundamento

El procedimiento se basa en la capacidad que tiene el complemento de conejo para dañar linfocitos recubiertos con anticuerpos linfocitotóxicos (87).

##### b. Material

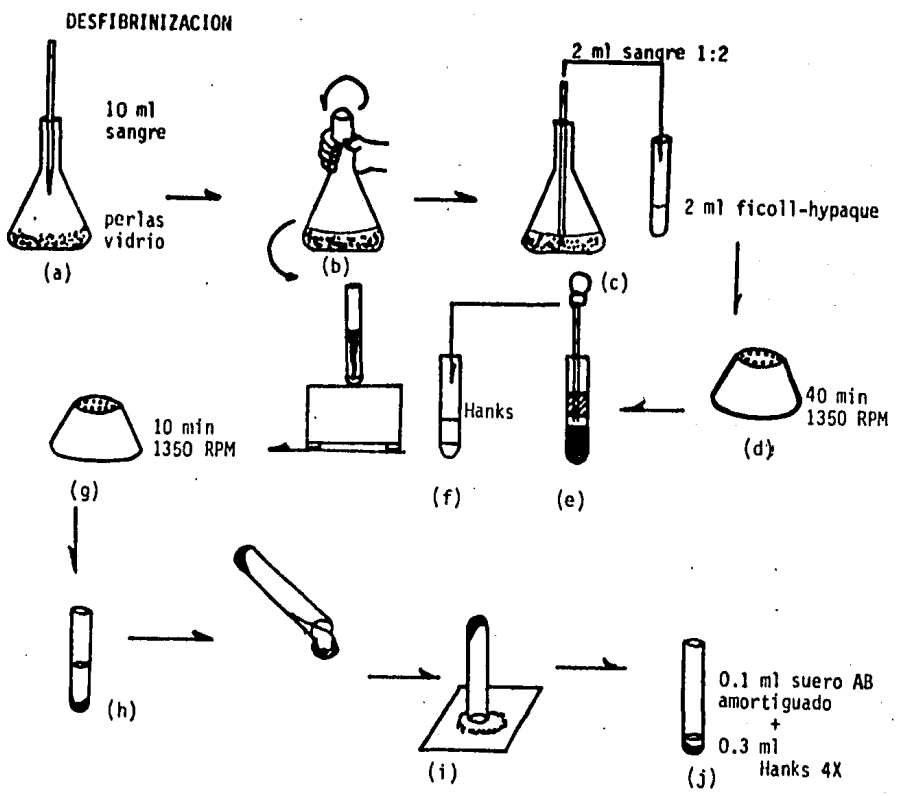
Se utilizó equipo, material de vidrio y de toma de muestras común en cualquier laboratorio de análisis clínicos y bancos de sangre.

### c. Procedimientos

#### Separación de linfocitos totales

La separación de células mononucleares de la sangre total se realiza utilizando una solución de ficoll-hypaque con densidad de  $1.077 \text{ g/cm}^3$ , la cual es ligeramente mayor a la de las células mononucleares y menor a la de los eritrocitos y granulocitos, de tal manera que al estratificar la sangre por centrifugación con esta solución, las células se separan de acuerdo a su densidad, quedando la capa de células mononucleares en la interfase formada por el plasma sanguíneo y la solución de ficoll-hypaque, descendiendo al fondo del tubo los eritrocitos y granulocitos.

Se tomaron 10 mL de sangre de 10 donadores normales (varones de grupo sanguíneo O positivo, sin antecedentes transfusionales) distribuyéndose cada muestra de sangre en un matríz erlenmeyer de 50 mL con ocho perlas de vidrio (figura 16a), se agitaron cuidadosamente con un movimiento rotatorio y suave durante 7 minutos o hasta la aparición de fibrina que es atrapada por las perlas de vidrio (figura 16b); con estas muestras desfibrinadas se hizo una dilución 1:2 usando solución salina fisiológica. En tubos de vidrio de 13 X 100 mm conteniendo 2 mL de ficoll-hypaque se estratificaron 2 mL de la sangre diluida y se centrifugaron a 1350 RPM ( $r=13$ ) durante 40 minutos (figuras 16 c y d). Se separó con pipeta pasteur



**DILUCIONES DE SUERO PROBLEMA CON HANKS 1X**

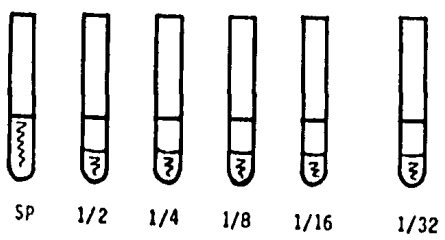


Figura 16. Separación de linfocitos totales y preparación del suero problema.



la capa de linfocitos formada en la interfase del suero y la solución de ficoll-Hypaque de cada tubo colocando cada muestra en un tubo de 13 X 100 mm (figura 16e). Los linfocitos fueron lavados con solución de Hanks 1X (ver soluciones) a 1350 RPM ( $r=13$ ) durante 10 minutos (figura 16f y g), se desechó el sobrenadante por decantación (figura 16h) y se secó el tubo colocándolo en forma invertida sobre papel absorbente (figura 16i). A cada tubo se agregó 0.1 mL de suero AB amortiguado (1.2 mL de suero sanguíneo de un donador normal de grupo sanguíneo AB, varón y sin antecedentes transfusionales; más 0.3 mL de solución de Hanks 4X.), para resuspender las células (figura 16j).

Desarrollo del método de linfocitotoxicidad. Terasaky (87). Se llenaron los pozos de una caja de Falcon con aceite mineral (figura 17a), con una jeringa Hamilton se colocó un microlitro del suero en estudio con la dilución (diluciones dobles en solución de Hanks 1X) correspondiente a cada pozo, se agregó un microlitro de la suspensión de linfocitos a los pozos correspondientes y se mezcló suavemente durante 3 minutos en un rotador (figura 17b y c); se incubó la placa 30 minutos a temperatura ambiente (figura 17d), a continuación se agregaron 5 microlitros de complemento de conejo a todos los pozos y se mezcló por rotación (figura 17e). Se incubó a temperatu

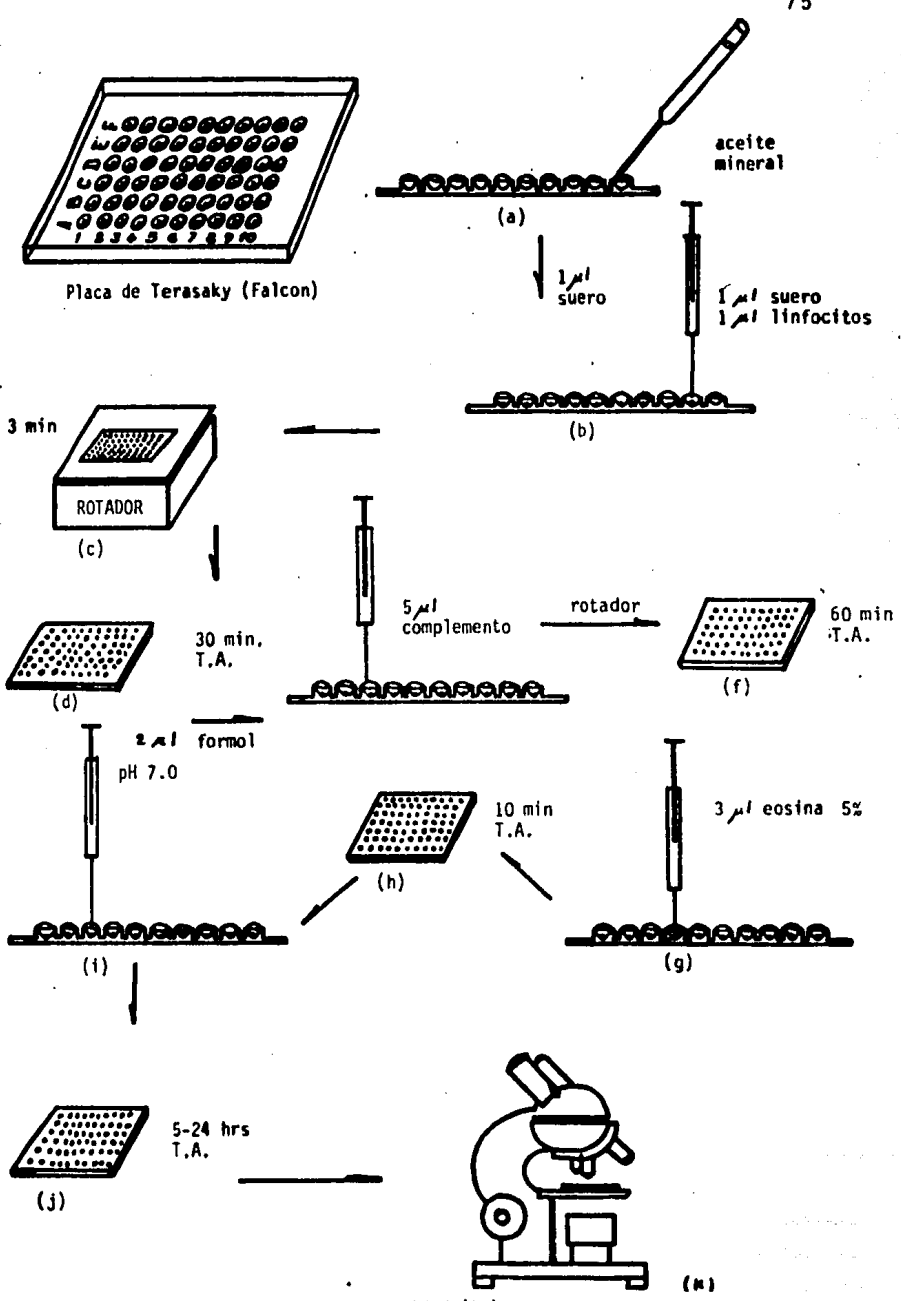


Figura 17. Método de linfocitotoxicidad (87).

ra ambiente por 60 minutos y se adicionaron a todos los pozos 3 microlitros de eosina al 5% (figura 17f y g), se mezcló y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente (figura 17h). Pasada la incubación se añadieron 2 microlitros de formol PH 7.0 (ver soluciones) y se cubrió la placa con una laminilla de cristal evitando la formación de burbujas (figura 17i). Se incubó a temperatura ambiente entre 5 a 24 horas (figura 17j) Se leyeron los pozos en un microscopio invertido de contraste de fases contando las células opacas y las células refringentes (figura 17k).

#### d. Interpretación de resultados.

Los resultados se reportaron utilizando un criterio de positividad relativa en cruces, dependiendo de la cantidad de células muertas (células opacas) encontradas en cada uno de los pozos de la placa del falcon (cuadro 11).

Cuadro 11. Interpretación de resultados para LCT

% DE CELULAS MUERTAS	POSITIVIDAD EN CRUCES
75-100	++++
50-70	+++
30-50	++
20-30	+
10-20	g
0-10	negativo

g = graniento

## 5. METODOS ESTADISTICOS

Para valorar la sensibilidad y especificidad (88) del método propuesto (IMP), se compararon los resultados obtenidos con éste, contra los obtenidos con la técnica de LCT, como se muestra en la tabla 3. La reproducibilidad del método de IMP se evaluó analizando una vez 50 sueros de donadores normales por separado y una vez por semana durante 10 semanas una alícuota congelada de la mezcla de éstos, anotándose el dato en una carta de control.

Probadas la sensibilidad, especificidad (cuadro 12) y reproducibilidad del método se procedió al análisis de los resultados obtenidos con la técnica de IMP determinando promedios, desviación estándar, rango y prueba "t" de student para muestras pequeñas para comparar los promedios obtenidos de los resultados negativos y positivos (89).

Cuadro 12. Definición matemática de especificidad y sensibilidad metodológicas entre las técnicas de IMP y LCT (89).

	LCT		
		POSITIVA	NEGATIVA
IMP			
POSITIVA		VP	FP
NEGATIVA		FN	VN

VP= No. de Verdaderos positivos      FN= No. de Falsos negativos

FP= No. de Falsos positivos      VN= No. de Verdaderos negativos

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{VN}}{\text{FP} + \text{VN}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \times 100$$

## V. RESULTADOS

Se probó la técnica de IMP con diferentes concentraciones de suero de donadores de grupo sanguíneo O positivo ( que contiene anticuerpos contra la sustancia de grupo sanguíneo A) y cantidades variadas de plaquetas de donadores de grupo sanguíneo A ( que tienen la sustancia de grupo sanguíneo A). Obteniéndose así una curva de titulación (figura 18), en la cual se observó que la cantidad de  $10^6$  plaquetas por mL y el suero diluido 1:4 fueron las concentraciones óptimas para la obtención de un 100% de IMP. Con base a estos resultados se realizó el método de IMP con plaquetas de donadores normales de grupo sanguíneo O positivo en una concentración de  $10^6$  plaquetas por mL y concentraciones diferentes de sueros de pacientes con LCT positiva (figura 19) y se observó que el suero sin diluir dió la respuesta óptima de 100% de IMP.

La población de pacientes estudiada se agrupó de acuerdo al diagnóstico clínico en cinco grupos: padecimientos mieloproliferativos, neoplasias, padecimientos con probable defecto inmunológico, inmunohematológicos, hemopatías y un grupo de pacientes sin datos clínicos. Para ver la posible relación entre los datos clínicos y la presencia de anticuerpos antiplaquetas se elaboró el cuadro 13 en donde se anotó la patología

el estado transfusional, gestacional y las reacciones post-transfusionales junto con los resultados obtenidos de las técnicas de LCT e IMP. En el cuadro 14 se concentraron los datos obtenidos de la prueba de LCT y la prueba de IMP, para cada grupo de patologías consideradas en el cuadro 1. Se anotaron los títulos de los resultados obtenidos en la prueba de LCT, los títulos y la calificación relativa de la intensidad de reacción (CRIR) con su media, desviación estándar y rango de positividad de la prueba de IMP, con el fin de observar las posibles diferencias entre los dos métodos y los resultados obtenidos de éstos con la patología encontrada en los pacientes estudiados. Para valorar la sensibilidad y especificidad (87) del método propuesto (IMP) se compararon el número de resultados positivos y negativos obtenidos con esta técnica contra el obtenido con la técnica de referencia (LCT), obteniéndose su valor relativo a través de las fórmulas anotadas en el capítulo de material y métodos; siendo la especificidad de 97.3% y la sensibilidad 94.4% como se indica en el cuadro 15.

Para analizar los resultados positivos y negativos de la prueba de IMP, los datos obtenidos se detallan en los cuadros 16a, 16b y 16c. En el cuadro 16a se anotan los resultados de los títulos y la calificación relativa de la intensidad de la reacción obtenidos en sueros de donadores normales con LCT ne

gativa, observándose que el máximo título de positividad en éstos casos es de 1:2 con una calificación relativa de la intensidad de la reacción (CRIR) promedio de 15.1 y un rango de 13.7 a 17.3. En el cuadro número 16b se encuentran los resultados de los títulos y la calificación relativa de la intensidad de la reacción promedio obtenidos con la técnica de IMP en sueros de pacientes con LCT negativa, observándose que el máximo título de positividad en estos casos es de 1:2 con una CRIR promedio de 16.2 y un rango de 13.7 a 18.7. En el cuadro 16c se anotaron los resultados de los títulos y la CRIR promedio obtenidos de sueros de pacientes con LCT positiva, notándose que el título más bajo es de 1:4 con una CRIR promedio de 25.4 y un rango de 32.1 a 18.7.

La reproducibilidad del método de IMP se realizó con el suero de 50 donadores normales, probándose una vez y mezclándose se congelaron y analizaron durante 10 semanas, graficándose el dato obtenido (figura 20).



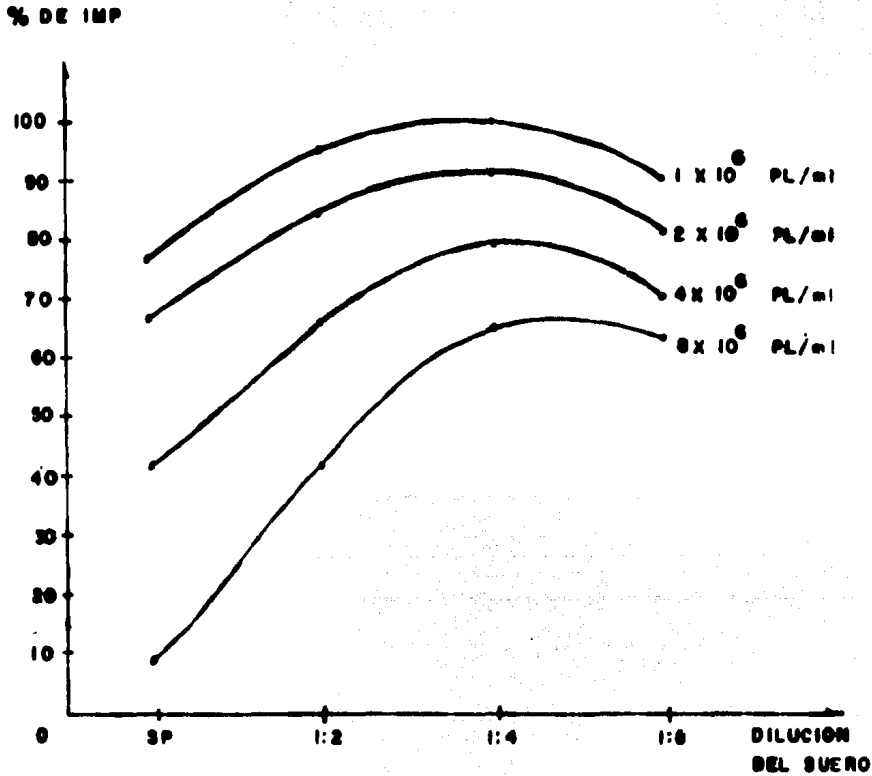


Figura 18. Curva de titulación del método de Inhibición de la Migración de Plaquetas (IMP). Con diferentes concentraciones de suero anti-AB y plaquetas (PL) de grupo sanguíneo "A".

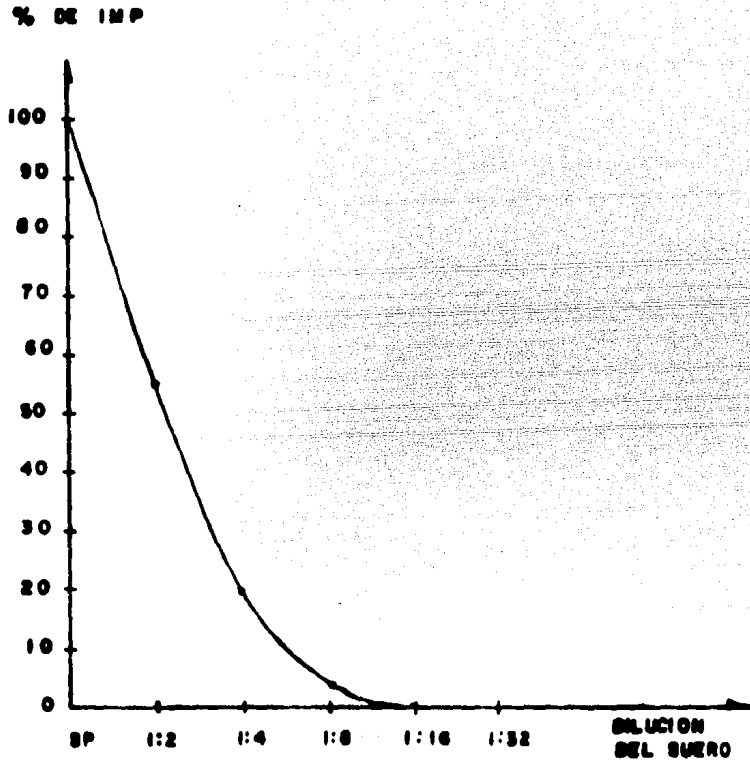


Figura 19. Curva de titulación del método de Inhibición de la Migración de Plaquetas (IMP). Con plaquetas de donadores normales de grupo 0 positivo ( $1 \times 10^6$  Pl/ml) y diluciones de un pool de 10 sueros con linfocitotoxicidad positiva.

Cuadro 13. Antecedentes asociados al padecimiento de pacientes politransfundidos y resultados obtenidos de IMP y LCT.

PATOLOGIA	n	REACCION		SEXO	GESTA	POLITRANS- FUSIONES	RPT
		IMP	LCT				
PADECIMIEN- TOS MIELO- PROLIFERA- TIVOS.	2	+	+	M	-	Si	Si
	2	+	+	F	MG	Si	Si
	1	-	-	M	-	Si	No
	2	-	-	F	MG	Si	No
NEOPLASIAS	2	+	+	F	MG	Si	Si
	1	+	+	F	MG	Si	SD
	1	-	+	F	1	Si	No
	5	-	-	F	MG	Si	No
	1	-	-	M	-	Si	No
PROBABLE DEFECTO INMUNOLOGI- CO	2	+	+	M	-	Si	1 No 1 SD
	5	+	+	F	1 No 4 MG	Si	2 Si 3 No
	1	+	-	M	-	Si	No
	5	-	-	F	No	3 Si 2 No	No
PADECIMIEN- TOS INMUNO- HEMATOLOGI- COS.	3	+	+	F	MG	No	No
HEMOPATIAS	3	+	+	M	-	Si	Si
	1	+	+	F	No	Si	Si
	2	+	+	F	SD	Si	Si
	5	+	+	F	MG	Si	Si
	1	-	-	F	MG	Si	No
SIN DATOS	9	+	+	F	SD	SD	SD
	2	-	-	F	SD	SD	SD

IMP = Inhibición de la migración de plaquetas

LCT = Linfocitotoxicidad

MG = Multigesta

RPT = Reacción post-transfucional

SD = Sin dato

n = No. de casos estudiados

Cuadro 14. Patrón de título y calificación de positividad de ACAP y ACLCT en suero de pacientes politransfundidos respecto a su patología.

PATOLOGIA	n	LCT TITULO	I M P				
			TITULO	CRIR	$\bar{x}$	$\pm S$	RANGO
PADECIMIENTOS NIELO-PROLIFERATIVOS.	4	1/4	1/32	43	52.3	13.2	65.5-39.1
		1/8	1/64	52			
		1/8	1/128	71			
		1/256	1/32	43			
	3	neg	neg				
NEOPLASIAS	3	1/2	1/8	32	36	4.6	40.6-31.4
		1/8	1/16	35			
		1/16	1/32	41			
	1	neg	1/32	38			
	6	neg	neg				
PADECIMIENTOS CON PROBABLE DEFECTO INMUNOLOGICO	3	SP	neg		47.5	9.7	57.2-37.8
		1/4	1/32	51			
		1/4	1/32	48			
		1/8	1/16	40			
		1/8	1/64	57			
		1/16	1/32	39			
		1/16	1/32	42			
	1/256	1/128	65				
5	neg	neg					
PADECIMIENTOS INMUNOHEMATOLOGICI		1/2	1/8	23	37.6	19.7	57.3-17.9
		1/2	1/8	30			
		1/8	1/64	60			
HEMOPATIAS	11	1/2	1/16	35	49.4	15.8	65.2-33.6
		1/4	1/32	43			
		1/4	1/64	69			
		1/16	1/16	27			
		1/16	1/16	40			
		1/32	1/64	52			
		1/32	1/64	56			
		1/64	1/128	67			
		1/64	1/128	74			
		1/128	1/16	32			
	1/256	1/64	48				
1	neg	neg					
SIN DATOS	9	1/2	1/8	35	43.1	12.9	56-30.2
		1/2	1/16	36			
		1/4	1/8	28			
		1/4	1/64	69			
		1/8	1/8	49			
		1/16	1/8	30			
		1/16	1/8	40			
	1/32	1/32	50				
1/128	1/64	51					
2	neg	neg					

n = No. casos  
 LCT = Linfocitotoxicidad  
 IMP = Inhibición de la migración de plaquetas  
 AcIP = Anticuerpos antiplaquetas  
 AcLCT = Anticuerpos linfocitotóxicos  
 SP = Suero puro  
 X = Promedio  
 S = Desviación estándar

Cuadro 15. Especificidad y sensibilidad de la técnica de IMP en relación con la de LCT a partir de los datos obtenidos.

IMP \ LCT	POSITIVA	NEGATIVA	TOTAL DE CASOS IMP
POSITIVA	37	1	38
NEGATIVA	1	17	18
TOTAL DE CASOS LCT	38	18	56

Especificidad de IMP = 97.3 %

Sensibilidad de IMP = 94.4 %

Cuadro 16. Tftulo de positividad, CRIR promedio y desviación estándar de los resultados obtenidos con la técnica de inhibición de la migración de plaquetas en el grupo...

a) de donadores normales con LCT negativa

Resultado	Tftulo	Casos	CRIR $\bar{X}$	$\pm S$
Negativo	1:1	9	0	0
Positivo	1:1	29	8.2	2.56
Positivo	1:2	12	15.1	2.23

b) de pacientes con LCT negativa

Resultado	Tftulo	Casos	CRIR $\bar{X}$	$\pm S$
Negativo	1:1	2	0	0
Positivo	1:1	7	8.8	2.4
Positivo	1:2	8	16.25	2.5

c) de pacientes con LCT positiva

Resultado	Tftulo	Casos	CRIR $\bar{X}$	$\pm S$
Positivo	1:4	5	25.4	6.7
Positivo	1:8	11	36.8	5.9
Positivo	1:16	7	41.7	4.8
Positivo	1:32	8	56.6	6.4
Positivo	1:64	6	66.2	8

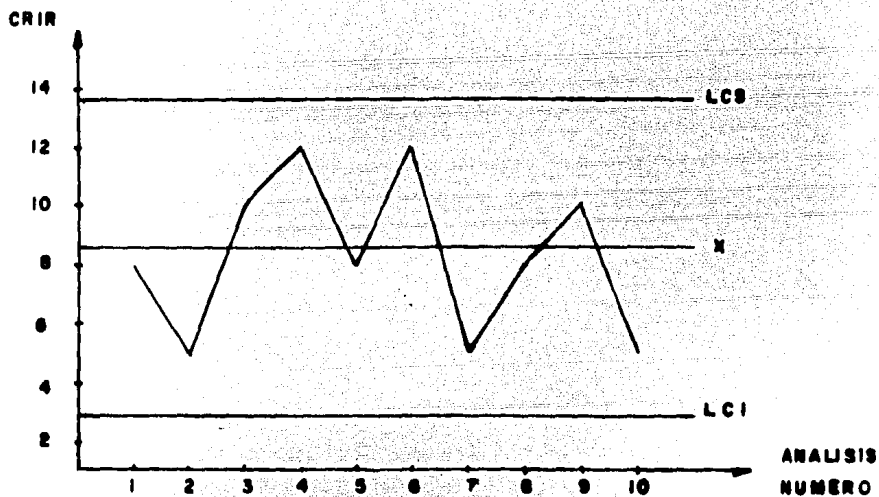


Figura 20. Gráfica de reproducibilidad del método del IMP, con media y límites de confianza, se grafica la calificación relativa de la intensidad de la reacción (CRIR) de 10 muestras analizadas de un pool de suero de donadores normales.

## VI. DISCUSION

La investigación de alo y autoanticuerpos antiplaquetas ha sido motivo de muchos años de trabajo. Las técnicas que se han manejado para la detección de estos anticuerpos como la aglutinación, el consumo de antiglobulina, la fijación de complemento, etc. son consideradas actualmente poco sensibles. Apparently las metodologías como la identificación de anticuerpos sobre la plaqueta, con una antiglobulina marcada con isótopos radioactivos o unida a enzimas son las técnicas actualmente más confiables, pero la tecnología es costosa y el personal que las maneje debe ser especializado (79,80).

La técnica de linfocitotoxicidad ha sido tradicionalmente empleada como alternativa ya que los antígenos HLA de clase I son compartidos por linfocitos y plaquetas, de hecho se ha encontrado congruencia en la identificación de estos anticuerpos entre la técnica de LCT con algunos procedimientos de investigación de plaquetas (90).

En este trabajo se observa que no hay una relación directa entre los títulos de anticuerpos linfocitotóxicos y los detectados por inhibición de la migración de plaquetas (cuadro 14), aunque en los valores de las diluciones realizadas los títu-



Los de positividad de los AcAP en términos generales son superiores con la técnica de IMP a los encontrados con la de LCT,

esto seguramente se debe a que la técnica de la linfocitotoxicidad solo detecta anticuerpos linfocitotóxicos y la de IMP además de éstos identifica anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos de plaquetas.

Debido a diferencias metodológicas la titulación de los AcAP en IMP se sujetó a una calificación relativa según la intensidad de la reacción y los títulos obtenidos en ésta, con lo que se consiguió el patrón de positividad de anticuerpos antiplaquetarios presentes en los pacientes politransfundidos que se agruparon en las patologías ya mencionadas. En los pacientes del grupo de padecimientos mieloproliferativos se encontró la CRIR promedio más alta siendo ésta de 52, siguiendo en orden descendente las hemopatías con 49.4, los pacientes con probable defecto inmunológico con 47.5, los inmunohematológicos con 37.6, y las neoplasias con 36 (cuadro 14). En estos pacientes la diferencia del valor de CRIR, puede especularse, sea debida a varios factores que influyen en grado variable en la capacidad de respuesta inmune del paciente así, podríamos plantear que los pacientes con padecimientos mieloproliferativos conservan su capacidad de responder al estímulo antigénico plaquetario a pesar de que muchos de ellos reciben qui

mioterapia que puede dar lugar a inmunosupresión (ej. metotrexate). En los pacientes con defecto inmunológico el desquiciamiento de la respuesta inmune, en alguna forma favorece la producción de anticuerpos anti-plaquetas. En las hemopatas aquí incluidas (hipoplasia medular y hemoglobinuria paroxística nocturna), es probable que la alteración que está produciendo estas enfermedades no afecta las células precursoras o el mecanismo de respuesta inmune al estímulo plaquetario. En los inmunohematológicos (iso-inmunización materno-fetal) aparentemente el estímulo por antígenos plaquetarios no es tan inmunogénico como el de los antígenos eritrocitarios, es bien conocido que la pancitopenia del recién nacido secundaria a este mecanismo excepcionalmente es severa (31). En las neoplasias, no sabemos si la alteración inmunológica que ha permitido la génesis del tumor, está afectando la capacidad de respuesta al estímulo antigénico plaquetario o, si la terapia inmunosupresora que generalmente reciben estos pacientes, está afectando dicha capacidad de respuesta (24).

En el grupo de pacientes estudiados en este trabajo y considerando la prueba de linfocitotoxicidad como la prueba de mayor sensibilidad para la investigación de anticuerpos antiplaquetas podemos estimar que la sensibilidad de la prueba de inhibición de la migración de plaquetas es de 94.4% y la especifi

idad es de 97.3% de acuerdo con lo anotado en el cuadro 15.

En los pacientes con LCT negativa la CRIR promedio fué similar a la obtenida en el grupo de donadores normales con LCT negativa (cuadros 16a y b). Es importante hacer notar que en la técnica de IMP se obtuvo cierto grado de positividad en el grupo de pacientes con LCT negativa y el grupo de donadores normales con LCT negativa (cuadros 16a y 16b), sin embargo la diferencia con el grupo de pacientes con LCT positiva (cuadro 16c) es patente, lo cual guarda similitud con lo observado en las técnicas de cuantificación de inmunoglobulina pegada a la superficie de plaquetas por medio del suero de antiglobulina marcada radioactivamente o unida a enzimas, en los cuales se ha demostrado una proporción mínima de inmunoglobulina presente en la membrana de células normales y en pacientes que habiendo sido transfundidos no se han sensibilizado aparentemente contra las plaquetas (65). Por lo que es indispensable hacer la prueba no solo con el suero total sino también con diluciones 1:2 y 1:4 a fin de asegurarse que los resultados obtenidos caen dentro de los valores encontrados en esta tesis, los que se calcularon en base a la tabla 16b, con un título máximo de 1:2 y una CRIR promedio de 18.7 (CRIR  $\bar{X} + S$ ), arriba de estos valores la prueba se considera positiva.

En el cuadro 14 se presenta un suero positivo a LCT en suero sin diluir y negativo a IMP, que se puede considerar como una falsa negativa de IMP. También se encontró un suero negativo a LCT y positivo a IMP; en este caso cabe la posibilidad de que el Ac detectado no haya sido un Ac contra Ag del sistema HLA sino contra Ag específicos de plaquetas, las cuales no pueden ser detectados por linfocitotoxicidad, o bien que sea un falso positivo de IMP.

Se observa también que el 71.4% de los pacientes con IMP positiva tiene el antecedente de reacción post-transfusional (cuadro 13), esto nos indica que los AcAP se encuentran relacionados con ella.

Es importante subrayar que la técnica de IMP es accesible a cualquier laboratorio de banco de sangre por ser una técnica menos complicada y particularmente de bajo costo ya que requiere solo de cámaras de Bloom hechas de material acrílico elaboradas por el propio laboratorio y un proyector de transparencias para magnificar el halo de migración. El tiempo de ejecución es largo al igual que el de linfocitotoxicidad por lo que no es una prueba de urgencias.

No es ocioso recordar la obligación de llevar a cabo la prueba en presencia de testigos positivo y negativo por duplicado.

## VII. CONCLUSIONES

1. El patrón de positividad y negatividad de los anticuerpos antiplaquetas (AcAP) con la técnica de IMP fué semejante al de la técnica de LCT empleada como referencia.
2. Posiblemente la técnica de IMP detecta cantidades mínimas de inmunoglobulina presentes en la membrana de plaquetas.
3. La patología y el tratamiento clínico con inmunosupresores juegan un papel importante en la intensidad de la reacción de los AcAP.
4. Con la técnica de IMP los resultados de AcAP se consideran negativos cuando presentan una calificación relativa de la intensidad de la reacción menor de 18.7 con un título máximo de 1:2, arriba de estos valores las reacciones son positivas.
5. Se encontró relación entre la detección de AcAP y el antecedente de reacción post-transfusional ya que el 71.4% de los pacientes con AcAP la habfan presentado.
6. El método de IMP presentó una sensibilidad de 94.4% y una especificidad de 97.3% por lo que se puede emplear confiada-

mente en la detección de AcAP y para la realización de pruebas cruzadas pretransfusionales, además de que se puede aplicar a cualquier laboratorio de banco de sangre por ser menos complicada y de menor costo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Zmijewski Ch M. Immunohematology. 3th ed. New York: Appleton-Century-Crofts, 1978:1.
- 2.- Schmidt PJ. Transfusion in America in the eighteenth and nineteenth centuries. N Eng J Med 1968; 279: 1319.
- 3.- Blundell J. Experiments on the transfusion of blood by the syringe. Med Chir Trans 1818; 9:56.
- 4.- Landsteiner K. Zur kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden wirkungen des blutserums und der lympe. Zbl Bakt 1900; 27:357.
- 5.- Landsteiner K, Wiener AS. An agglutinable factor in human blood recognizable by immune sera for rhesus blood. Proc Soc Exp Biol 1940; 43:223.
- 6.- Dausset J. Leuco-agglutinins. IV. Leuco-agglutinins and blood transfusion. Vox Sang 1954; 4: 190.
- 7.- Miescher P, Fauconnet M. Mise in évidence de differents groupes leucocytaires chez l'homme. Schweiz Med Wschr 1954; 84: 597.
- 8.- Dausset J. Iso-leuco-anticorps. Acta Haemat 1958; 20:156
- 9.- Payne R, Rolfs MR. Leucocyte agglutinins in human sera. Arch Intern Med 1957; 99: 587.
- 10.- Huestis DW, Bove JR, Buschs S. Blood components, fractions and derivates. Practical blood transfusion. 2nd ed. Bos-

- ton: Little Brown, 1976: 285-311.
- 11.- Mc Cullough J. Symposium on blood transfusion: practice and science. Hum Pat 1983; 14:203.
  - 12.- Hiirch EO, Gardner FH. The transfusion of human blood platelets. J Lab Clin Med 1952; 39:556.
  - 13.- Stefanini M, Dameshek W, Adelson E. Platelets VII. Shortened platelet survival time, and development of platelet agglutinins following multiple platelet transfusion. Proc Soc Exp Biol 1952; 80-230.
  - 14.- Tullis JL, Finch RJ, Baudanza P. Plateletpheresis in a disposable system. Transfusion 1971; 11:368.
  - 15.- Tomasulo PA. Management of the alloimmunized patient with HLA-matched platelets. Platelet physiology and transfusion. Washington D.C. American Association of Blood Banks 1978:77.
  - 16.- Bell CA, ed. A seminar on immune-mediated cell destruction. Chicago, Illinois 1981: 157, 176-182.
  - 17.- Erslev AJ, Gabuzda TG. Hematología: aspectos fisiopatológicos. 2da ed. Interamericana, 1981: 157-60.
  - 18.- White JG, Gerrard JM: Platelet morphology and the ultrastructure y regulatory mechanism involved in platelet activation In: Platelet: A multidisciplinary approach. Gaetano G ed. Raven Press, 1970:17.
  - 19.- Escribá PA, Malvenda CMP. Fisiología de la hemostasia.



In: Medal SL ed. Hematología, México, 1982:480-500 (consultarse GR ed. Medicine; serie 1; no. 8).

20.- Smith JB. The postanoids in hemostasis and thrombosis. Am J Path 1980; 99:743.

21.- Williams JW, Beutler E, Erslev AJ,undles RW. Hematología. 2<sup>da</sup> ed. Barcelona: Salvat, 1983:1417.

22.- Douglas SD. Human lymphocyte growth in vitro: morphologic biochemical and immunologic significance. Rev Exp Pathol 1971; 10:41.

23.- Erslev AJ, Gabuzda TG. Hematología: Aspectos fisiopatológicos. 2<sup>da</sup> ed. México: Interamericana, 1981:132-137.

24.- Stites DP, Fudenberg HH, Stobo JD, Wells JV. Inmunología básica y clínica. 4<sup>ta</sup> ed. México: El Manual Moderno, 1983: 77-84,758,764,22.

25.- Smith LH, Thier SO. Fisiopatología. 1<sup>ra</sup> ed. Buenos Aires Ed. Medica Panamericana, 1983:139-144, 347-350, 365.

26.- Reinherz EL, Schlossman SF. The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell 1980; 19: 821.

27.- Douglas SD. Electron microscopic and functional aspects of human lymphocyte response to mitogens. Transplant Rev 1972; 11:39.

28.- Playfair JHL. Immunology at a glance. 2nd ed. London: Blackwell Scientific Publications 1982: 2,4.

29.- Stobo JD. Interacciones celulares en la expresión y re-

gulación de la inmunidad. En Stites DP, Fudenberg NH, Stobo JD, Wells JV eds. *Inmunología básica y clínica*. México: El Manual Moderno, 1983:91-98.

30.- Mc Devitt H. Regulation of the immune response by the major histocompatibility system. *N Engl J Med* 1980; 303:1514.

31.- Mollison PL. *Blood transfusion in clinical medicine*. 7th ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1983:632,651, 703, 197, 226-8, 211-2.

32.- Córdoba F. Inmunogenicidad. *Rev Lat-amer Microbiol* 1970; 12:213-215.

33.- Sela M. Antigenicity: some molecular aspects. *Science* 1969; 166:1365.

34.- Sell S. *Inmunología e inmunidad*. 2<sup>da</sup> ed. México: Harper and Row Lationamericana, 1981:6-7.

35.- Miller WV, Harmon JA. Platelet serology and transfusion. *Human Pathol* 1983; 14:221-227.

36.- Harmon JA, Miller WV. Platelet antibodies: their detection and significance. *Am J Med Tech* 1981; 47:797-800.

37.- Kelton JG. The amount of blood group A, B antigens on platelets is proportional to the amount that is free in the plasma. *Transfusion* 1980; 20:265.

38.- Aster RH. Effect of anticoagulant and ABO incompatibility on recovery of transfused human platelet. *Blood* 1965; 26:732.

- 39.- Duquesnoy RJ, Anderson AJ, Tomasulo PA. ABO compatibility and platelet transfusion of alloimmunized thrombocytopenic patients 1979; 54:595.
- 40.- Liebert M, Aster RH. Expression of HLA-B12 on platelet, on lymphocytes and in serum: a quantitative study. Tissue 1977; 9:199.
- 41.- Szatkowski NS, Aster RH. HLA antigens of platelet. IV. Influence of "private" HLA-B locus specificities on the expression of BW4 and BW6 on human platelets. Tissue Antigens 1980; 15:361.
- 42.- Anónimo. Laboratory medicine: immune thrombocytopenias and platelet antibodies (editorial). Mayo Clin Proc 1982; 57: 778.
- 43.- Van Loghem JJ, Dorfmeijer H, van der Hart M. Serological and genetical studies on a platelet antigen (Zw). Von Sang 1959; 4:161.
- 44.- van der Weerdt CM, van der Wiel, Dorfmeijer H, Engelfriet CP. A new platelet antigen. in: proceedings of the eighth congress of european society of haematology. Basel, S. Karger, 1961; 6:242.
- 45.- Moulinier J. New observations on the platelet group Duzo Vox Sang 1961; 6:242.
- 46.- Shulman NR, Marder VJ, Hiller MC. Platelet and leukocyte isoantigens and their antibodies: serologic, physiologic and

clinical studies. Prog Hematol 1964; 4:222.

47.- Von dem Borne AEGK, von Riesz E, Verheugt FWA. BaK<sup>a</sup>, a new platelet-specific antigen involved in neonatal allo-immune thrombocytopenic. Vox Sang 1980; 30:113.

48.- Martinez SJL (traductor). Estructura y funcionamiento de los antígenos histocompatibles. En "Libros de investigación y ciencia". Inmunología. 1ra ed. Barcelona: Labor 1983:200-211.

49.- Schwartz BD. Complejo principal de histocompatibilidad HLA humano. En Stites DP, Fudenberg HH, Stobo JD, Wells JV eds. Inmunología básica y clínica. México: El Manual Moderno, 1983: 55-66.

50.- Bach FH. The HLA class II genes and products the HLA-D region. Immunology Today 1985; 6:89-94.

51.- Palomeque RJ (traductor). Estructura de los anticuerpos. En "Libros de investigación y ciencia". Inmunología. 1ra. ed. Barcelona: Editorial Labor 1983:33-41.

52.- Porter RR. Structural studies of immunoglobulins. Science 1973; 180:713-716.

53.- Tomasi TB, Grey HM: Structure and function of immunoglobulin 1972. A Prog Allergy 1972; 16:81.

54.- David JR, Goetzl EJ, Austen KF. Inmunología: estructura y función de las inmunoglobulinas humanas. En: Thier SO, Smith LH, eds. Fisiopatología. México: Ed. Médica Panamericana, 1983: 145-156.

- 55.- Natving JB, Kunkel HG. Immunoglobulins: classes, subclasses, genetics variants, and idiotypes. *Adv Immunol* 1973; 16:1.
- 56.- Putman FW. Immunoglobulin structure: variability and homology. *Science* 1969; 163:633-643.
- 57.- Kelton JG, Gibbons S. Autoimmune platelet destruction: idiopathic thrombocytopenic purpura. *Sem Thromb Haemost* 1982; 8:83-104.
- 58.- Rosse WF, Adams JP, Yount WJ. Subclasses of IgG antibodies in immune thrombocytopenic purpura (ITP). *Br J Haematol* 1980; 46:109-114.
- 59.- Neame PB, Hirsh J. Increased platelet destruction. *Sem Thromb Haemost* 1982; 8:75-82.
- 60.- Klein ChA, Blajchman MA. Alloantibodies and platelet destruction. *Sem Thromb Haemost* 1982; 8:105-115.
- 61.- Kelton JG, Blanchette VS, Wilson WE. Neonatal thrombocytopenia due to passive immunization. *N Engl J Med* 1980; 302:1401-1403.
- 62.- Shulman NR. Immunologic reactions to drugs. *N Engl J Med* 1972; 287:408-409.
- 63.- Neame PB, Hirsh J. Increased platelet destruction. *Sem Thromb Haemost* 1982; 8:75-82.
- 64.- Kelton JG, Gibbons S. Autoimmune platelet destruction: idiopathic thrombocytopenic purpura. *Sem Thromb Haemost* 1982; 8:83-104.

- 65.- Hauch TW, Rosse WF. Platelet-bound complement (C3) in immune thrombocytopenia. Blood 1977; 50:1129.
- 66.- Zucker MB, Lay AB, Borrelli J. Thrombocytopenia with a circulating platelet agglutinin, platelet lysis and clot retraction inhibitor. Blood 1959; 14:148-161.
- 67.- Quintanar de RE, García NE, Parga TB y cols. Utilidad del laboratorio del banco de sangre en la terapéutica transfusional. Anuario de Actualización en Medicina Hematológica IMSS 1977; vol IX, No. 25: 95-117.
- 68.- González LMG. Desleucocitación de paquetes globulares con uno a diez días de antigüedad de almacenamiento. Tesis receptacional. UNAM-ENEP Zaragoza 1985.
- 69.- Duquesnoy RJ, Larentzen DF, Aster RH. Platelet migration inhibition. A new method for detection of platelet antibodies. Blood 1975; 45:741-747.
- 70.- Maples JA, Yokoyama MM, Inboriboon P, Inboriboon A, Chao W. Platelet migration inhibition test for platelet antibodies: parameters and simplified methodology. Archs Allergy Appl Immun 1977; 54:374-377.
- 71.- Howell E, Perkins HA: Microtiter modifications of the complement fixation test for platelet antibodies. Transfusion 1968; 8:33.
- 72.- Lisak GE, Grumet FC. A new micromethod for the in vitro detection of antiplatelet antibodies: C-FDA thrombocytotoxicity.

city. Human Immunol 1980; 1:87.

73.- Karparkin M, Sinkind GW, Karparkin S. The platelet factor 3 immunoinjury technique reevaluated. Development of a rapid test for antiplatelet antibody. Detection in various clinical disorders, including drug-induced and neonatal thrombocytopenias. J Lab Clin Med 1977; 89:400.

74.- Heinrich D, Gutschank s, Mueller-Eckhardt C. HLA-antibody induced <sup>14</sup>C-serotonin release from platelet. A methodological analysis. Vox Sang 1977; 33:65.

75.- Hirschman RJ, Yankee RA, Collier BS. Sensitive methods for the detection and characterization of platelet isoantibodies. Thromb Diathes Haemorrhah 1973; 29:408.

76.- Aster RH, Enright SA. A platelet and granulocyte membrane defect in paroxymal nocturnal hemoglobinuria: usefulness for the detection of platelet antibodies. J Clin Invest 1969; 48:1199.

77.- Dolbeare FA. Platelet aggregation as a quantitative immunologic technique. Immunol Commun 1973; 2:65-76.

78.- Von dem Borne, Verheugt FWA. A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. Br J Haematol 1978; 39:195.

79.- Gudino M, Miller WV. Application of the enzyme linked immunospecific assay (ELISA) for the detection of platelet antibodies. Blood 1981; 57:32-37.

- 80.- Kirkley J, Fabre JW.  $^{125}\text{I}$  anti-immunoglobulin binding assay for the detection and characterization of anti-platelet antibodies. *Hum Immunol* 1980; 1:369.
- 81.- Kekomaki R. Detection of platelet-bound IgG with  $^{125}\text{I}$  labelled staphylococcal protein A. *Med Biol* 1977; 54:112.
- 82.- Mc Millan R, Smith RS, Longmire RL. A technique for the quantitation of platelet-associated immunoglobulins. *Blood* 1969; 34:850.
- 83.- Salmassi S, Yokoyama MM, Maples JA, Matsui Y. Detection of platelet antibody using rosette technique with anti-IgG antibody coated polyacrylamide gel. *Vox Sang* 1980; 39:264.
- 84.- Nathan P. The migration of platelets in vitro. *Thromb Diath Haemorrh* 1973; 30:173.
- 85.- Lowenhaupt RW, Gluek HI. The effect of cytochalasin B on platelet migration. *Fed Proc* 1974; 33:243.
- 86.- Valone FH, Goetzl EJ. Modulation of the random migration of human platelets. *J Clin Invest* 1974; 54:1100-1106.
- 87.- Mittal KK, Mickey MR, Singal DP, Terasaki PI. Serotyping for homotransplantation. XVII. Refinement of microdroplet lymphocyte cytotoxicity test. *Transplantation* 1968; 6:913.
- 88.- Mendez RI, Namihira GD, Moreno AL, Sosa MC. El protocolo de investigación: Lineamientos para su elaboración y análisis 1ra edición. México: Ed. Trillas, 1984:171-3.
- 89.- Curso para capacitación en diseño experimental y estadfs



tica. México 1983. Instituto Mexicano del Seguro Social.

90.- Brand A, Van Leeuwen A, Earnisse JG and van Rood JJ. platelet transfusion therapy. Optimal donor selection with a combination of lymphocytotoxicidad and platelet fluorescence tests. Blood 1978; 51:781-788.