

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

**ROL DE LA INTEGRINA BETA-3 Y DE  
SUS ANTICUERPOS ESPECIFICOS EN  
LA PURPURA TROMBOCITOPENICA  
AUTOINMUNE Y EN EL SIDA**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS**  
(INMUNOLOGÍA)

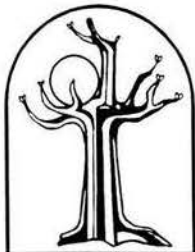
PRESENTA:

**M. EN IBB MA. VICTORIA DOMÍNGUEZ GARCÍA**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. CARLOS LARRALDE RANGEL**

MÉXICO, D.F. 2005



m341985



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Este trabajo de Tesis se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La dirección estuvo a cargo del Dr. Carlos Larralde Rangel y contó con el apoyo técnico de la M en C Tzipe Govezensky Zack

El comité tutorial que evaluó el desarrollo de la tesis estuvo integrado por:

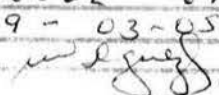
Dr. Carlos Larralde Rangel  
Dra. Goar Gevorkian Markosian  
Dr. Juan Carlos Almagro Domínguez

El jurado para examinar este trabajo fue:

Presidente: Dr. Edmundo Lamoyi Velázquez  
Secretario: Dr. Eduardo Sada Díaz  
Vocal: Dr. Jesús Chimal Monroy  
Vocal: Dr. José Moreno Rodríguez  
Vocal: Dr. Héctor Mayani Viveros  
Suplente: Dra. Goar Gevorkian Markosian  
Suplente: Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros

Este proyecto de investigación fue apoyado en dos ocasiones por el programa PADEP de la UNAM.

Durante el desarrollo de los créditos de doctorado la autora contó con una beca del CONACYT y una beca del IMSS

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: MA. VICTORIA DOMINGUEZ GARCIA  
FECHA: 9 - 03 - 05  
FIRMA: 

*Y por eso inventó la muerte: para que la vida – no tú ni yo – la vida, sea  
para siempre*

**Jaime Sabines**

***Dedico esta tesis y todo el trabajo y tiempo invertidos en ella, porque siempre han estado a mi lado motivándome y alentándome***

A mis hijos Victor Andrés y Aura Lucía, porque siempre serán mi estímulo. Y ahora también a Karina y a mi pequeña Andrea.

A Mercedes por su gran fe y fortaleza de espíritu, que son ejemplo a seguir para vencer todos los obstáculos, por más grandes que parezcan. Aunque al final el cáncer la venció. Siempre recordaré con mucho cariño, las palabras que me dijiste con inmenso amor “dale a otros la oportunidad de decirte que no”.

A Enrique Efraín, porque aún que ya te fuiste, siempre estás en mis sueños, llenándome con tu presencia en el gusto por la poesía.

A Salvador, porque siempre estás en los momentos más importantes de mi vida.

A mis 9 hermanos, que están como los dedos de mis manos, siempre junto a mí, para poder acariciar los sueños.

A todos mis sobrinos.

A mis compañeros de otro gran reto en mi vida: Héctor César, Lolita, Luis Castellanos, Edel, Maryam, Anita, Jessica y todos los integrantes del Laboratorio Clínico del Centro Médico ISSEMyM

*Algún día llegará la noche. En eso pensábamos y nos pondremos a descansar. Ahora se trata de cruzar el día, de atravesarlo como sea para correr del calor y del sol. Después nos detendremos. Después. Lo que tenemos que hacer por lo pronto es esfuerzo tras esfuerzo para ir de prisa detrás de tantos como nosotros y delante de otros muchos.*

*Juan Rulfo*

## AGRADECIMIENTOS

### A mi comité tutorial

- Al Dr. Carlos Larralde por su comprensión y apoyo, pero sobre todo por su exigencia para mi formación académica. Siempre recordaré que el laboratorio del Dr. Larralde nunca tiene las puertas cerradas, en todos los sentidos.
- A la Dra. Goar Gevorkian, siempre dispuesta a escuchar y poner orden y claridad a las ideas desordenadas de sus alumnos. Espero haber aprendido a dar la jerarquía a lo realmente importante.
- Al Dr. Juan Carlos Almagro, porque siempre fue un placer escuchar sus sugerencias y palabras de estímulo.

### A mis asesores

- A Tzipe Govezensky, que ha sido mi tutora aunque la Coordinación de Enseñanza no se lo permita. Muchas gracias por no esperar a tener títulos para ser toda una gran investigadora, siempre recordaré “los experimentos bien diseñados siempre pueden analizarse”
- A Gerardo Arrellín, por sus enseñanzas en el manejo de los ratones, las necropsias y la preparación de órganos para la inclusión en parafina.
- A Ismael Rodríguez, por su plática amena mientras me ayudaba con los cortes y la asesoría para las tinciones de inmunohistoquímica.
- A Ruth Hernández, por su ayuda desinteresada en la observación de los cortes histológicos.
- Al personal de la unidad de Patología del Hospital de Cardiología del CMN S XXI, del IMSS.
- Al Dr. Mansilla, jefe de la Unidad de Investigación Biomédica del Hospital de Cardiología del CMN SXXI, IMSS.
- Al Dr. José Moreno, jefe de la Unidad de Investigación en Enfermedades Autoinmunes del Hospital de Especialidades del CMN SXXI, IMSS. Y a todos sus colaboradores.
- A Raúl Nieto, mi siempre ejemplo a seguir en cuanto a la capacidad de enseñanza y didáctica.
- Al Dr. Héctor Rodríguez por ser siempre mi gran aliado para quitarle a la vida la enseñanza, no importando la edad biológica.

Al IMSS por 2 años de beca.

Tiempo suficiente para comprometerme en este proyecto, aunque para terminar tuviera que hacer un gran esfuerzo.

Al CONACYT

Porque los 4.5 años de beca me sirvieron para comer y construir un techo, para compartir con mis hijos.

A mi jurado

Por revisar pacientemente mis ideas

A mis compañeros de laboratorio

Alejandro, porque a pesar de estar lejos siempre tuve tu asesoría y palabras de ánimo.

Mónica, porque siempre anduvimos juntas esta gran aventura.

Nacho Terrazas, Dr. Karen Manoutcharian, Natasha Ivanova, Alberto, Hugo, Eric, Carmen, Yetsi y Doña Chuy

A mis compañeros de otros laboratorios

A las secretarias porque además de hacer su trabajo con alegría siempre fueron mis amigas

Violeta, Blanca, Azucena, Isabel, Amada, Dulce

*Porque las penas con pan son buenas, pero con amigos siempre son más ligeras.*



## INDICE GENERAL

	PAGINA
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	
1. Púrpura trombocitopénica autoinmune	5
2. Antecedentes del presente trabajo	6
3. Integrina beta 3	8
4. Estructura de la tesis	10
TRABAJO EXPERIMENTAL	
1. HIPÓTESIS	14
2. JUSTIFICACIÓN DE LA HIPÓTESIS	14
3. OBJETIVOS	15
4. RESULTADOS	16
<b>Domínguez V</b> , Govezensky T, Gevorkian G, Larralde C. Low platelet counts alone do not cause bleeding in an experimental immune thrombocytopenic purpura in mice. <i>Haematologica</i> 2003; 88: 679-87.	
5. RESULTADOS ADICIONALES	25
RESULTADOS COLATERALES	
1. <b>Domínguez V</b> , Gevorkian G, Govezensky T, Rodríguez H, Viveros M, Cocho G, Macotela Y, Maso F, Pacheco M, Estrada JL, Lavallo C, Larralde C. Antigenic Homology of HIV-1 GP41 and Human Platelet Glycoprotein GPIIIa (Integrin $\beta$ 3). <i>J Aq Immune Def Syn Hum Retrovir.</i> 1998; 17:385-90.	30
2. Gevorkian G, Manoutcharian K, Almagro JC, Govezensky T, <b>Dominguez V</b> . Identification of Autoimmune Thrombocytopenic Purpura-Related Epitopes Using Phage-Display Peptide Library. <i>Clin Immunol Immunopathol.</i> 1998; 86:305-9.	37
3. GevorkianG, Maoutcharian K, Govezensky T, Cano JA, <b>Dominguez V</b> , Santamaria H, Larralde C. Identification of Mimotopes of of Platelet Autoantigens Associated with Autoimmune Thrombocytopenic Purpura. <i>J Autoimmunity</i> 2000;15: 3-40.	43
DISCUSION GENERAL	52
CONCLUSIONES	60
PERSPECTIVAS	61

	PAGINA
APÉNDICE	
MARCOS TEORICO	
1. PURPURA TROMBOCITOPENICA AUTOINMUNE. <b>Domínguez V</b> y Rodríguez H. Mecanismos celulares y bioquímicos involucrados en la fisiopatogenia de la púrpura trombocitopénica autoinmune. <i>Gaceta Médica de México</i> . 2002; 138: 461-472. Artículo de revisión.	62
2. PLAQUETAS <b>Domínguez V</b> y Ambriz R. Bioquímica y fisiología plaquetaria. <i>Revista de Hematología</i> . 2001(a); 2: 117-127. Artículo de revisión.	75
3. INTEGRINAS <b>Domínguez V</b> y Rosales C. Integrins: their role in ligand recognition and cell activation in human immunodeficiency virus type 1 infection. <i>Revista de Hematología</i> . 2001(b); 2: 46-54. Artículo de revisión.	87
4. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTIPLAQUETA <b>Domínguez V</b> y Govezensky T. Metodología de laboratorio para la detección de anticuerpos plaquetarios. <i>En Temas de Medicina Transfusional</i> . Ed. Prado. México, 2000 pp 271-277.	97
BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA	104

## RESUMEN

---

La integrina beta 3 (glucoproteína IIIa) es una proteína transmembranal que junto con la integrina alfa IIb (glucoproteína IIb) constituye uno de los principales receptores de activación plaquetaria. Este receptor se expresa, exclusivamente, en la membrana de las plaquetas y los megacariocitos. La integrina beta 3 también forma otro receptor con la integrina alfa V. A diferencia del receptor anterior, este se expresa también en las células endoteliales, los osteoclastos y otros tipos celulares. Ambos receptores forman parte de la subfamilia beta 3 de la familia de las integrinas, la principal familia de receptores de adhesión de la membrana celular.

La púrpura trombocitopénica autoinmne (PTA) es una enfermedad hemorrágica causada por el aumento en la destrucción de plaquetas recubiertas por autoanticuerpos dirigidos en contra de receptores proteicos de su membrana. Se atribuye a la integrina beta 3 el ser el principal blanco de los autoanticuerpos. Aunque es ampliamente aceptado que la trombocitopenia es la responsable de los signos hemorrágicos, los mecanismos de la destrucción plaquetaria, de la hemorragia y del origen de los anticuerpos son aún oscuros. Esta tesis pretende aclarar algunos puntos importantes en cuanto a los probables epitopos de la integrina  $\beta_3$  de los anticuerpos y la probable participación de las células del endotelio vascular en la fisiopatogenia del sangrado.

En cuanto al estudio del mecanismo de la fisiopatogenia de la hemorragia, se montó un modelo de púrpura inmune en ratones, con los anticuerpos policlonales de conejo en contra de plaquetas humanas y en contra de plaquetas de ratón. Los resultados demostraron la hemorragia es independiente de los niveles de plaquetas y solo se asocia con la cantidad de

anticuerpos administrados. Además se demostró por inmunohistoquímica la unión de los anticuerpos anti-plaqueta a las células endoteliales de vasos pequeños. De este modelo se deduce la probable participación de las células endoteliales en la fisiopatología del sangrado en la PTA.

Usando una biblioteca de péptidos expresados al azar en el fago M3 se investigó el probable repertorio de epitopes de los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes con PTA. Ninguno de los epitopes reportados se había descrito previamente. La secuencia SLHPT se encuentra en la proteína gpIb, la secuencia PFGSP tiene una gran homología con la secuencia PLGSP de la integrina  $\beta_3$ , y la secuencia GHSSTP es homóloga a la secuencia AHTTP de la gpIb. Cada una de las secuencias reportadas puede representar un epítopo lineal o ser parte de un determinante antigénico más grande.

También se probó una biblioteca de 12 aminoácidos en el fago M13 con los anticuerpos policlonales anti-plaquetas humanas, así como, los anticuerpos monoclonales anti-integrina  $\beta_3$  y anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Los resultados de este estudio identificaron tres secuencias con gran homología con la glucoproteína gpIb.

Los resultados asientan la diversidad de epitopes involucrados en la molécula integrina  $\beta_3$  e indican la posible participación de daño endotelial en el sangrado asociado a la PTA.

## ABSTRACT

---

The protein beta 3 belongs to the major cellular adhesion family: integrins. The beta 3-integrin family consists of  $\alpha_{IIb}\beta_3$  found on platelets, megakaryocytes and endothelial cells, and the more widely distributed  $\alpha_v\beta_3$ . The beta 3 subunit consists of a large extracellular domain, a single transmembrane segment, and a relatively short cytoplasmic tail.

The  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (gpIIb/IIIa) plays a major role in the regulation of platelet adhesion and aggregation during haemostasis. Upon platelet activation by an agonist a signaling process is initiated, termed "inside-out" signaling, which gives rise to conformational changes within  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . These conformational changes increase the affinity of the receptor for its primary ligand, fibrinogen. Bound fibrinogen then acts as a bridging molecule facilitating the interaction of adjacent platelets. Upon fibrinogen binding,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  undergoes further conformational changes and through a process termed "outside-in" signaling the receptor signals in to the platelet ultimately resulting in acceleration of the aggregation process. Autoimmune thrombocytopenic purpura (AITP) is an hemorrhagic disorder widely thought to be caused by excessive destruction of anti-platelet autoantibody-coated platelets by macrophages of the reticuloendothelial system, and  $\alpha_{IIb}\beta_3$  is the principal target for antiplatelet autoantibodies. Although it is generally accepted that thrombocytopenia is responsible for hemorrhage, the mechanisms of platelet destruction, hemorrhage and the production of platelet autoantibodies is still unknown.

This thesis pretends to clarify some important issues about the epitopes of platelet autoantibodies involved and the possible participation of vascular endothelial cells in the pathophysiology of AITP.

An ITP experimental model in Balb/c mice was developed to test the role of transferred homologous antibodies on platelet counts and hemorrhage. Immune thrombocytopenia and bleeding were studied in mice injected with anti-mouse and anti-human platelet polyclonal rabbit IgG. Three different doses of anti-platelet IgG caused the platelets to drop, but bleeding occurred only with high doses of anti-platelet IgG irrespective of the platelet levels. Immunohistochemistry revealed some anti-platelet antibodies bound to vascular endothelium: a suggestion that antibody mediated endothelial activation, in addition to thrombocytopenia, could be participating in ITP bleeding.

Using the combination of polyclonal autoimmune sera with a random peptide phage-display library it was possible to identify a repertoire of epitopes recognized by autoantibodies from AITP patients. None of the peptides identified in this study has been described previously as a possible epitope for platelet autoantibodies. The sequence SLHPT is present in platelet gpIb. The sequence PFGSP has high homology with  $\beta_3$  integrin-derived sequence PLGSP, and the sequence GHSSTP is homologous to AHTTP from gpIb. Each sequence may represent a linear epitope or part of a larger antigenic determinant. The library of dodecapeptides displayed randomly as a fusion to the minor coat protein of phage M13 was also screened with rabbit anti-human platelet polyclonal antibodies, anti-human platelet integrin  $\beta_3$ , and anti-human platelet integrin complex  $\alpha_{IIb}\beta_3$  mAbs. This study has shown that three identical clones selected with rabbit anti-human platelet antibodies had some homology with stretches of amino acid residues within human platelet gpIb.

# INTRODUCCIÓN

---

## 1. Púrpura trombocitopénica autoinmune

La púrpura trombocitopénica autoinmune (PTA) es una enfermedad hemorrágica, en la cual se producen autoanticuerpos en contra de antígenos de las plaquetas. Estos anticuerpos recubren a las plaquetas que posteriormente son fagocitadas por los macrófagos del sistema retículo endotelial del bazo y del hígado principalmente ( George, *et al.*, 1996; Frederiksen, *et al.* 1999, Alves-Rosa, *et al.*, 2000).

La fagocitosis plaquetaria conduce a la trombocitopenia, es decir, niveles disminuídos de plaquetas en la circulación sanguínea. Y debido a que se piensa que el único órgano blanco de los autoanticuerpos son las plaquetas, se ha clasificado a la PTA como una enfermedad autoinmune órgano-específica (Gilliland, *et al.*, 1998; Shevach, *et al.*, 1999).

A pesar de que aún que no se ha encontrado correlación directa entre el sangrado y los niveles en las cifras de plaquetas, en general se acepta que la trombocitopenia es la responsable de los signos hemorrágicos (George, *et al.*, 1996). Y a pesar de que no existen métodos diagnósticos, de uso común, con la suficiente sensibilidad y especificidad para demostrar la presencia de los anticuerpos antiplaqueta, se ha podido demostrar la presencia de autoanticuerpos en el suero de los pacientes con PTA, hasta en el 78% de los casos, si se usa una combinación de varios métodos (Warner, *et al.*, 1999).

En la mayoría de los pacientes se encuentran mezclas de anticuerpos que reaccionan con más de una proteína ( Ruyi, *et al.*, 1994; Hou, *et al.*, 1995), pero se ha reconocido que la subunidad  $\beta_3$  del receptor de fibrinógeno es el principal blanco de los autoanticuerpos, de

todas las proteínas de la membrana plaquetaria. Este receptor llamado gpIIb-IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) pertenece a la familia  $\beta_3$  de las integrinas (Woods, *et al.*, 1984; Fujisawa, *et al.*, 1992). La PTA puede ser idiopática, cuando no existe otra enfermedad de fondo, y secundaria, cuando existe otra enfermedad autoinmune subyacente. Por ejemplo, en el lupus eritematoso sistémico (LES), es frecuente la asociación de PTA. Otro ejemplo es el síndrome de Fisher Evans en el que coincide anemia hemolítica autoinmune (AHAI) y PTA. También, se presenta un cuadro clínico similar a la PTA, en alrededor de un 30% de los pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) producido por la infección del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) (Gilliland, 1998).

## **2. Antecedentes del presente trabajo**

En mi práctica profesional en el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, participé activamente en la atención de los pacientes con enfermedades hemorrágicas: en especial a los pacientes que acudían a la “Clínica de Hemofilia” y a la “Clínica de Púrpuras”. El director del Banco de Sangre, el Dr. Héctor Rodríguez Moyado, y la jefa del laboratorio, la QFB Elisa Quintanar García, se interesaron en ofrecer alternativas de tratamiento a los pacientes con PTA crónica y refractaria a los tratamientos convencionales. Junto con el Dr. Raúl Ambríz Fernández estudiaron la forma de detectar “bazos accesorios” en aquellos pacientes que a pesar de estar esplenectomizados, seguían destruyendo las plaquetas. Los eritrocitos de los pacientes se opsonizaron, *in vitro*, con IgG anti-D (Rho) y se marcaron con tecnecio (Tc 99m), se reinfundieron y después, por medio de una radiografía se identificaron los sitios en donde se concentraba la marca radiactiva. De esta forma se localizaron los ganglios



linfáticos que funcionaban como “bazos accesorios”, mismos que se retiraron mediante cirugía. Sorpresivamente, algunos de los pacientes al recibir los eritrocitos opsonizados mostraron aumento en la cifra de plaquetas. En algunos otros no se encontró remisión de la trombocitopenia pero sí remisión del sangrado (Ambriz, *et al.*, 1987). Desde entonces y hasta la fecha se adoptó el uso de eritrocitos opsonizados (sin la marca radiactiva) como un tratamiento alternativo en la PTA.

Para profundizar en el estudio de otras opciones terapéuticas fui aceptada en el laboratorio del Dr. Carlos Larralde Rangel, quien con su grupo de trabajo, estaba trabajando con péptidos sintéticos de *Taenia crassiceps* (Gevorkian, *et al.*, 1996) y un péptido sintético de la gp41 del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) (Gevorkian, *et al.*, 1996) para uso en el diagnóstico y vacunación (Toledo, *et al.*, 1999). El Dr. Larralde se interesó en abordar el estudio de la PTA empleando como herramienta péptidos sintéticos. De esta forma, en mi tesis de maestría preparé 3 péptidos sintéticos de las regiones más hidrofílicas de la integrina  $\beta_3$ : el péptido PV-1 (DRKEFAKFEEERARA) del dominio intracitoplasmático (aa 749-763), el péptido PV-2 (KKFDREPYMTENTC) y el péptido PV-3 (GCPQEKEKSFTIKP) del dominio extracitoplasmático (aa 644-657 y aa 431-444 respectivamente). Encontré que en el suero de los pacientes con púrpura trombocitopénica autoinmune (PTA) hay anticuerpos que reconocen a los péptidos PV-2 y PV-3 de la proteína. Debido a que los péptidos PV-2 y PV-3 se localizan en el dominio extracelular de la integrina, concluí que, posiblemente estos anticuerpos anti-PV-2 y anti-PV-3 están involucrados en la opsonización de las plaquetas y su posterior fagocitosis por los macrófagos del sistema fagocítico mononuclear (Domínguez, 1998).

Por otra parte, también encontré que los pacientes VIH+ tienen anticuerpos que reconocen a los péptidos plaquetarios mencionados y en especial al péptido PV-1 de la región intracitoplasmática de la integrina  $\beta_3$ . Parece ser que los anticuerpos que reconocen al péptido PV-1 lo hacen en forma cruzada, debido a que este péptido tiene homología estructural con una región del dominio extracápside de la gp41 del virus de la inmunodeficiencia tipo 1 (VIH-1) (Domínguez, *et al.*, 1998). La púrpura de los enfermos de SIDA podría deberse a los anticuerpos anti-PV-1 evocados por la región homóloga en gp41 del VIH. Con estos resultados surgió el objetivo de estudiar el papel que juega la integrina  $\beta_3$  y sus anticuerpos en la PTA y en el SIDA.

### **3. Integrina beta 3**

La integrina beta 3 (glucoproteína IIIa) es una proteína transmembranal que junto con la integrina alfa IIb (glucoproteína IIb) constituye uno de los principales receptores de activación plaquetaria. Este receptor se expresa, exclusivamente, en la membrana de las plaquetas y de los megacariocitos. El complejo ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) se conoce también con el nombre CD49/CD61 y es el principal receptor del fibrinógeno, proteína soluble que por acción de la trombina se convierte en la fibrina insoluble para formar el coágulo sanguíneo. Funciona también como receptor de otros ligandos: la vitronectina y el factor von Willebrand. La integrina beta 3 también forma otro receptor con la integrina alfa V. A diferencia del receptor anterior, además de la expresión en la membrana de las plaquetas y de los megacariocitos, se expresa también en la membrana de las células endoteliales, los osteoclastos y otros tipos celulares. El complejo  $\alpha_V\beta_3$  se conoce también con el nombre CD51/CD61 y es el principal receptor de la vitronectina. Ambos receptores forman parte de

la subfamilia beta 3 de la familia de las integrinas, la principal familia de receptores de adhesión de la membrana celular (Albelda, *et al.*, 1990; Clark, *et al.*, 1995).

El gene de la integrina  $\beta_3$  se localiza en el cromosoma 17, en la región q21-23 y codifica para una proteína de 788 aminoácidos. Su peso molecular calculado por su estructura primaria es de 84.5 kD y por tener 6 sitios de N-glicosilación tiene un peso molecular de 95 kD en condiciones no reductoras y de 110 kD en condiciones reductoras. La estructura proteica presenta tres dominios: un dominio amino-terminal extracitoplasmático (aa 1-680) del cual el péptido líder (aa 1-26) se elimina de la proteína madura, un dominio transmembranal (aa 681-740) y un dominio carboxi-terminal intracitoplasmático (aa 741-788). El dominio extracelular, sitio de reconocimiento de sus ligandos, contiene 4 regiones ricas en cisteínas, lo cual le permite formar numerosos puentes disulfuro. El dominio intracitoplasmático presenta dos tirosinas que son fosforiladas cuando el receptor une sus ligandos (Philips, *et al.*, 1991; Smyth, *et al.*, 1993).

Este receptor se activa al unir su ligando y envía la señal de activación (“*outside in*”) al interior de la célula, y también es posible que se active por la activación del interior celular (“*inside out*”) (Shattil, 1999). Cuando una plaqueta pasa del estado de reposo al estado activado se aumenta la afinidad por sus ligandos, y también se aumenta el número de receptores disponibles de 40 000 a 80 000 copias, por movilización de los receptores presentes en los gránulos alfa plaquetarios (Sonnenberg, 1993).

## **4. Estructura de la tesis**

### **4.1 Marcos Teóricos**

Mi comité tutorial decidió que, algunas de las actividades académicas estuvieran encaminadas a revisar las publicaciones relacionadas con mi tema, motivo por el cual, en la sección correspondiente al apéndice I de esta tesis se incluyen los artículos publicados, como resultado de las revisiones bibliográficas de cada una de las actividades académicas. Se amplió mi conocimiento de la PTA por medio de una revisión bibliográfica de los mecanismos bioquímicos involucrados en la fisiopatogenia, revisión que se publicó en la revista “Gaceta Médica de México”, que es el órgano oficial de difusión de la Academia Nacional de Medicina (Domínguez, *et al.*, 2002). Para conocer a fondo la estructura y función de las plaquetas se realizó una revisión bibliográfica de la bioquímica plaquetaria, que se publicó en la revista mexicana “Hematología”, órgano oficial de difusión de la Asociación Mexicana para el Estudio de la Hematología (Domínguez, *et al.*, 2001a). Para continuar con el estudio de la reactividad de los anticuerpos de los pacientes VIH positivos, con el péptido PV-1, se realizó una revisión bibliográfica del papel que tienen las moléculas de adhesión de la familia de las integrinas en el reconocimiento de sus ligandos y la activación celular en la infección por el VIH-1 (Domínguez, *et al.*, 2001b). Se abordó también, en forma colateral, el problema que existe en la PTA de contar con una técnica diagnóstica que certifique la presencia de anticuerpos en contra de antígenos plaquetarios. Este problema surge por la dificultad de no tener los antígenos purificados y por no contar con una herramienta que sea de fácil manejo en los laboratorios clínicos. Por tal motivo se realizó una revisión bibliográfica crítica de los métodos actuales para el diagnóstico de la

PTA y se publicó en un libro conmemorativo de los 40 años del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (Domínguez, *et al.*, 2000).

## **4.2 Trabajo Experimental**

Esta tesis presenta los resultados del estudio de la PTA desde tres puntos de vista:

A) El estudio del papel de los anticuerpos antiplaqueta en la fisiopatogenia del sangrado se abordó con un modelo experimental de púrpura inmune en ratones BALB/c. En primer lugar se montó el modelo con anticuerpos antiplaquetas completas, para después poder comparar el efecto con la administración de los anticuerpos anti-PV-2 y anti-PV-3. Fue necesario explorar si los anticuerpos antiplaquetas humanas podían reconocer antígenos en las plaquetas de los ratones y si eran capaces de producir trombocitopenia y sangrado. Los anticuerpos antiplaqueta se produjeron en conejos hembra *New Zealand*. Los conejos se inmunizaron con:

- a) Membranas de plaquetas humanas
- b) Membranas de plaquetas de ratón
- c) Péptido PV-2
- d) Péptido PV-3
- e) Amortiguador de fosfatos (PBS)

En todos los casos la fracción purificada de inmunoglobulinas G (IgG's) que contenía los anticuerpos antiplaqueta se administró a ratones machos BALB/c. Se pudo observar que los anticuerpos antiplaquetas humanas producen trombocitopenia y sangrado en los ratones, pero en forma moderada y que los anticuerpos antiplaquetas de ratón lo hacen en forma más severa. El sangrado fue dosis dependiente y no así los niveles de plaquetas. De acuerdo a estos resultados, se decidió investigar con detalle la cinética de lo que ocurría al

administrar los anticuerpos en los ratones. Estos resultados fueron más interesantes que lo que ocurrió con los anticuerpos anti-péptidos de la integrina  $\beta_3$ . Y considero que debe ser el tema central de esta tesis, por lo cual se decidió incluir este artículo en la sección de Resultados, y la justificación de la hipótesis, la hipótesis y los objetivos se refieren en concreto a este tema (Domínguez, *et al.*, 2003)

B) Investigar si los anticuerpos anti péptidos de la integrina  $\beta_3$  participan activamente en esta fisiopatogenia. El anticuerpo anti-PV-2 no produjo trombocitopenia, ni sangrado en los ratones a los cuales se les administró y no fue posible obtener anticuerpos anti-PV-3 en las conejas que se inmunizaron con el péptido correspondiente. Debido a que estos resultados no fueron como se esperaba y no se publicaron, se presentan en la sección de Resultados Adicionales.

C) Dilucidar el papel que juega la integrina  $\beta_3$  y sus anticuerpos en la fisiopatogenia del SIDA. Se publicaron los resultados de la homología antigénica entre el péptido PV-1 de la región intracitoplasmática de la integrina  $\beta_3$  y el péptido PY-1 de la región extracápside de la proteína gp41 del VIH-1 (Domínguez, *et al.*, 1998). Este artículo se incluye en el apéndice I de esta tesis.

Por sugerencia del jurado del examen de candidatura al grado de doctora, se decidió, no trabajar más con este tema de reactividad cruzada con el VIH-1. A pesar de ser un tema muy interesante, no se contaba con el tiempo necesario para continuar con ambas líneas de investigación.

Por otra parte, en colaboración con la Dra. Gevorkian, el Dr. Manoutcharian, el Dr. Juan Carlos Almagro y la M en C Tzipe Govezensky se identificó los probables epitopes

relacionados con PTA. Este estudio se realizó con una técnica de “Phage Display”. La proteína pIII de la capa del fago M3, presenta péptidos de 7 aminoácidos en combinaciones al azar. Los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes con PTA reaccionan con los fagos M3 que tienen los péptidos con las secuencia de aminoácidos específica para los anticuerpos, y de esta forma es posible explorar los epitopes de los anticuerpos (Gevorkian, *et al.*, 1998).

Los anticuerpos policlonales de conejo, anti-plaquetas humanas, así como un anticuerpo monoclonal específico para la integrina  $\beta_3$  (clona Y2/51) y un anticuerpo monoclonal específico para el receptor de fibrinógeno completo, el complejo gpIIbIIIa (clona 5B12), también se estudiaron por medio de la técnica de “Phage Display” (Gevorkian, *et al.*, 2000).

Los artículos con estos resultados se incluyen en la sección de Resultados Colaterales de esta tesis.

## **TRABAJO EXPERIMENTAL**

---

### **HIPÓTESIS**

Es probable que las plaquetas no sean el único órgano blanco de los autoanticuerpos y el endotelio vascular juegue un papel fundamental en el mecanismo de la hemorragia en los pacientes con púrpura trombocitopénica autoinmune

### **JUSTIFICACIÓN DE LA HIPOTESIS**

En los pacientes con PTA no se ha encontrado una relación directa entre la cifra de plaquetas y la magnitud de la hemorragia, por lo que se propone un modelo de laboratorio para investigar la correlación entre la concentración de anticuerpos séricos, la trombocitopenia y el síndrome hemorrágico.

Las células endoteliales y las plaquetas comparten muchos receptores de adhesión y activación celular. Entre estos receptores se encuentran:

- a) La integrina beta 3, en el receptor  $\alpha_{IIb}\beta_3$  en las plaquetas y en el receptor  $\alpha_V\beta_3$  en las plaquetas y en las células endoteliales
- b) El receptor rico en leucinas gpIb-V-IX
- c) La selectina E
- d) La selectina P
- e) El receptor CD40
- f) El receptor ICAM-1



## **OBJETIVOS**

1. Desarrollar un modelo experimental murino de púrpura trombocitopénica inmune.
2. Preparar en conejos anticuerpos policlonales anti-plaquetas humanas y de ratón.
3. Investigar si existe reactividad cruzada entre anticuerpos anti-plaquetas humanas con plaquetas de ratón.
4. Estudiar la correlación entre los niveles séricos de anticuerpos anti-plaquetas y la trombocitopenia.
5. Estudiar la correlación entre trombocitopenia y hemorragia.
6. Investigar el mecanismo de hemorragia y la posible participación del endotelio vascular.
7. Estudiar el papel de los anticuerpos anti-PV2 y anti-PV3 en la fisiopatogenia del sangrado en la PTA.

## RESULTADOS

En esta sección se presenta el artículo principal de esta tesis. Se prepararon membranas de plaquetas humanas y de ratón para inmunizar conejos y obtener los anticuerpos correspondientes. Los anticuerpos presentaron reacción cruzada, los anticuerpos anti-plaquetas de ratón reaccionaron, *in vitro*, con un lisado de plaquetas humanas y los anticuerpos anti-plaquetas humanas se fijaron, *in vivo*, a determinantes antigénicos de las plaquetas de ratón. El modelo murino de púrpura inmune reprodujo la trombocitopenia y las manifestaciones hemorrágicas observadas en los pacientes con PTA. Siendo la hemorragia dosis dependiente, y la trombocitopenia no. Un hallazgo muy importante fue que los anticuerpos anti-plaqueta se unen específicamente a células endoteliales, lo que sugiere que un posible daño endotelial puede estar involucrado en la fisiopatogenia del sangrado en la PTA.

**Domínguez V**, Govezensky T, Gevorkian G, Larralde C. Low platelet counts alone do not cause bleeding in an experimental immune thrombocytopenic purpura in mice. *Haematologica*. 2003; 88: 679-87.

## Low platelet counts alone do not cause bleeding in an experimental model of immune thrombocytopenic purpura in mice

VICTORIA DOMÍNGUEZ, TZIPE GOVEZENSKY, GOAR GEVORKIAN, CARLOS LARRALDE

**Background and Objectives.** The physiopathogenesis of hemorrhagic phenomena in patients with autoimmune thrombocytopenic purpura is associated with low platelet levels. In the present work the relation between thrombocytopenia and bleeding was examined. The possible participation of endothelial cells in bleeding was also investigated.

**Design and Methods.** Immune thrombocytopenia and bleeding were studied in mice injected with anti-mouse and anti-human platelet polyclonal rabbit IgG. Platelet levels were measured at different times and bleeding signs were systematically recorded. ANOVA tests were used to compare platelet levels. Binding of anti-platelet antibodies to vascular endothelial cells was analyzed by immunohistochemistry.

**Results.** Three different doses of anti-platelet IgG caused the same low platelet levels, but bleeding occurred only with high doses of anti-platelet IgG irrespective of the platelet levels. No inflammation around blood vessels was observed in paraffin-embedded tissue sections of organs. Immunohistochemistry demonstrated anti-platelet antibodies bound to vascular endothelium.

**Interpretation and Conclusions.** We showed lack of correlation between platelet counts and bleeding in a murine model. The binding of anti-platelet IgG to endothelial cells of small vessels is an indication that antibody-mediated endothelial activation, in addition to thrombocytopenia, could be participating in bleeding.

**Key words:** immune thrombocytopenic purpura, hemorrhagic disease, murine model, anti-platelet antibodies, endothelial cells.

Haematologica 2003; 88:  
[http://www.haematologica.org/2003\\_06/](http://www.haematologica.org/2003_06/)

©2003, Ferrata Storti Foundation

Autoimmune thrombocytopenic purpura (AITP) is a hemorrhagic disorder widely thought to be caused by excessive destruction of anti-platelet autoantibody-coated platelets by macrophages of the reticuloendothelial system, occurring mainly in the spleen and in the liver.<sup>1-4</sup>

The platelet membrane glycoproteins gpIIb-IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ , classical fibrinogen receptor) and gpIb-V-IX (classical von Willebrand factor receptor)<sup>5-9</sup> are the main targets of autoantibodies in patients with AITP (16.7-83.3% and 13.3-83%, respectively).<sup>10</sup> Kosugi *et al.*<sup>11</sup> demonstrated that 29% of AITP patients also have specific autoantibodies to  $\alpha V\beta_3$  (classical vitronectin receptor). There are also reports that other membrane proteins have epitopes recognized by anti-platelet autoantibodies, for example gpIaIIa (classical collagen receptor) and CD62.<sup>12,13</sup> Our previous studies, using a phage display library, as well as those of other groups, have shown that the sera of patients with AITP contain a complex mixture of anti-platelet autoantibodies with a wide range of specificities for a number of different epitopes, some of them corresponding to autoantigens.<sup>14-16</sup> There is, therefore, the possibility that these autoantibodies may react with other cells and add to the pathogenesis of AITP.

There is evidence that platelet and endothelial cells have a common origin. Hematopoietic and vascular cells have a common progenitor stem cell in embryonic stages<sup>17</sup> and, in adult life, CD34<sup>+</sup> stem cells from bone marrow can form new blood vessels.<sup>18</sup> Platelets bear many membrane proteins also found in endothelial cells: a) gpIIb-IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) complex is an integrin receptor found exclusively in megakaryocytes and platelets, but shares the  $\beta_3$  chain with integrin  $\alpha_v\beta_3$  present in megakaryocytes, platelets, endothelial cells and other cells;<sup>19,20</sup> b) gpIb-V-IX, a leucine rich-receptor, is also found in endothelial cells;<sup>21,22</sup> c) E-selectin, P-selectin, CD40 and ICAM-1 are receptors that participate in platelet rolling and are found in both cellular types.<sup>23-25</sup> Moreover, the vascular endothelium is constantly in contact with platelets and actively participates in many hemostatic mechanisms such as platelet rolling, platelet activation and inactivation, thrombus formation and regulation, etc.<sup>26,27</sup> However, the possible participation of endothelial cells in the pathophysiology of AITP has received little attention.

Experimental animal models of AITP have been used to study mechanisms of platelet destruction,<sup>28</sup> treatment schemes,<sup>29-31</sup> the role of immunoglobulin recep-

From the Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (VD, TG, GG, CL), Banco Central de Sangre, Centro Médico Nacional SXXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F. (VD).

Correspondence: Victoria Domínguez, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70228, México D.F. 04510.  
E-mail: mavi@biomedicas.unam.mx

tors in different reactions<sup>32-35</sup> and to characterize antiplatelet antibodies interfering with normal platelet function.<sup>36</sup> In the present study we describe the influence of different doses of anti-platelet antibodies on thrombocytopenia and bleeding, a point that has not been extensively explored.<sup>37,38</sup> BALB/c mice received rabbit immune polyclonal anti-human and anti-mouse platelet IgG and the kinetics of thrombocytopenia and hemorrhagic signs were recorded. Furthermore, binding of anti-platelet antibodies to vascular endothelial cells was analyzed by immunohistochemistry.

## Design and Methods

### *Mice and platelet counts*

Eight-week old BALB/c male mice were used. Mice were originally purchased from Jackson Laboratories (Bar, Harbor Maine, USA) in 1982, and have been maintained in controlled conditions through  $b \times s$  mating at our animal facilities for more than 20 generations.

Fifty microliters of whole blood were obtained from the retro-orbital plexus by puncture, under ether anesthesia, and collected in 1 mL polypropylene tubes (Eppendorf; Marsh Biochemical Products, Rochester, NY, USA) containing 0.5 mL of phosphate-buffered saline (PBS) with 2% ethylenediaminetetraacetic acid disodium (EDTA). The platelets were counted in an automatic cell counter (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA).

### *Preparation of human platelets to use as immunogen*

Three outdated O Rh<sup>+</sup> platelet concentrates, kindly provided by the Banco Central de Sangre, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Mexico, were centrifuged at 800 g for 10 minutes. The pellet of platelets was washed three times with PBS (pH 7.4) containing 10 mM-EDTA and 0.02% BSA (bovine serum albumin), and then  $0.6 \times 10^9$  platelets/mL were frozen at  $-70^\circ\text{C}$  overnight. Platelets were thawed and washed five times in PBS. Aliquots of 1 mL of platelets were frozen at  $-20^\circ\text{C}$ .<sup>39</sup>

### *Preparation of mouse platelets to use as immunogen*

Blood from forty mice was harvested from the retro-orbital venous plexus by puncture and collected in polypropylene tubes containing 0.1 mL of acid-citrate-dextrose (ACD, 38 mM citric acid, 75 mM trisodium citrate, and 100 mM dextrose). Platelet-rich plasma was obtained by centrifugation at 320 g for 10 minutes.

After a second centrifugation at 800 g for 10 minutes platelets were prepared as described above.

### *Rabbit anti-mouse and anti-human platelet antiserum*

Six New Zealand female rabbits were immunized by the platelet preparations to produce anti-human and anti-mouse platelet polyclonal antibodies. One milliliter ( $0.6 \times 10^9$  platelets) of each platelet preparation was thawed and injected subcutaneously into the rabbits on days 1, 15, 30 and 45. The first dose was injected in a mixture with 1 mL of complete Freund's adjuvant, the subsequent doses were injected with 1 mL of incomplete Freund's adjuvant. Animals were bled two weeks after the last injection. IgG anti-platelet antibodies were purified using a Protein A-Sepharose column (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA). A control antibody was prepared from the sera of 2 rabbits injected only with PBS and adjuvant.

### *Preparation of human platelet proteins to use as antigen in the ELISA*

The platelet pellets of 30 (O Rh<sup>+</sup>) outdated platelet concentrates, kindly provided by the Banco Central de Sangre, Centro Médico Nacional Siglo XXI, México, were obtained by centrifugation at 320 g for 10 minutes and then pooled and washed 3 times with TBS-EDTA, pH 7.4 (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM). The pellet was then treated with lysis buffer TBS-1% triton, pH 7.4 (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, triton 1%, leupeptin  $10^{-5}\text{M}$ , phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) 1 mM) (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) for 30 min, centrifuged at 1800 g for 30 min and the supernatant collected and frozen at  $-70^\circ\text{C}$ .

### *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

Each well of a 96-well microtiter plate (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) was coated with 100  $\mu\text{L}$  of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  platelet proteins in carbonate buffer (50 mM sodium carbonate, pH 9.8) at 37°C for 60 min and washed five times with PBS-0.3% Tween (pH 7.4), followed by blocking with PBS-1% BSA-0.3% Tween (pH 7.4) at 37°C for 30 min. After five washes plates were incubated with 100  $\mu\text{L}$  of rabbit sera diluted 1:100 in PBS-1% BSA-0.3% Tween (pH 7.4) at 37°C for 60 min. The plates were washed again and incubated at 37°C for 60 min with 100  $\mu\text{L}$  of phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) diluted 1:5000. Then *p*-nitrophenylphosphate in diethanolamine buffer (pH 9.8) was added, and after incubation of the plates at 37°C for 30 min, the absorbance was measured at 405 nm.

**Immune thrombocytopenia in Balb/c mice**

In the first experiment mice were bled under ether anesthesia as mentioned above and injected intraperitoneally (ip) with a single dose of purified anti-mouse or anti-human platelet IgG or control IgG (0.1, 0.5 and 1.0 mg/mouse in 100  $\mu$ L sterile PBS). The intraperitoneal route was selected to avoid the possibility of intravascular clogging by instantaneous exposure of platelets to high concentrations of the anti-platelet IgGs. Three mice were used in each experimental group. Blood samples were drawn every 24 hours and the external bleeding signs (ecchymoses, petechiae, blood in stools) were recorded. In a second experiment mice were bled (as above) and injected with 0.1 and 1.0 mg/mouse of anti-mouse platelet IgG every 24 hours, over 4 days (2 mice/group) and their external bleeding signs (ecchymoses, petechiae, blood in stools) were recorded. In a third experiment mice were bled (as above) and injected with 1.0 mg of purified anti-mouse platelet IgG or purified control IgG or PBS only. Mice were bled for platelet counts and sacrificed 0, 2, 4, 8, or 24 hours after injection (3 mice per each experimental group). The mice was sacrificed by exposure to a CO<sub>2</sub> atmosphere. Signs of external and internal bleeding were recorded and the organs (liver, kidney, small intestine, gut, spleen, lungs, heart, and skin) were collected in PBS-10% formalin for microscopic examination. Three additional mice (1 control, 2 injected with 0.1 mg/mouse or 1 mg/mouse of purified anti-mouse platelet IgG) were killed 4 hrs after injection by cervical dislocation to avoid congestion caused by the CO<sub>2</sub> atmosphere.

**Histopathology and immunohistochemistry**

Organs collected in PBS-formalin were embedded in paraffin, sectioned (6 mm thickness) and stained with hematoxylin-eosin. Histologic sections were examined by light microscopy. Cryostat sections (5  $\mu$ m) of fresh-frozen tissue were post-fixed in acetone. Sections were treated with 3% hydrogen peroxide. Blank sections were then incubated with PBS, negative control sections with control IgG and test sections with rabbit anti-mouse platelet IgG (1 mg/100  $\mu$ L). After incubation for 30-min, the sections were treated with goat anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase (Zymed, San Francisco, CA, USA) diluted 1:40 (30 minutes). After three washes with PBS, the sections were treated for 1 to 2 minutes with freshly prepared 3'3'-diaminobenzidine (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA). The slides were counterstained with hematoxylin. Sections were mounted on glass slides with cytosel mounting medium (Stephen Scientific, Riverdale, NJ, USA).

**Statistical analysis**

Intergroup differences of platelet counts were compared with analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's studentized range analysis; a repeated measurements design was used when needed. Statistical analysis was performed using the SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC27511, USA, 6.02) statistical software program.

**Image processing**

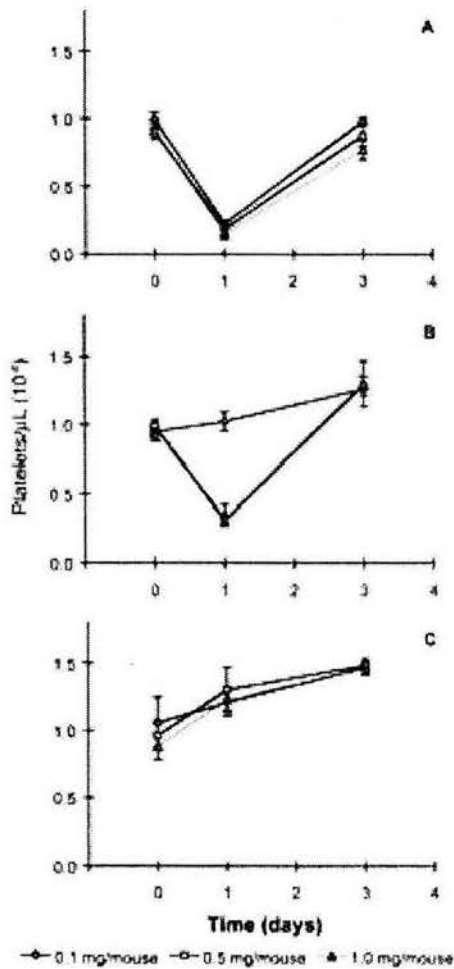
Color photographs were digitalized (200 dpi) and processed as a whole image using Adobe Photoshop™ 5.5. The images were filtered isolating the red channel and setting its source components as follows: red +76, green +36, blue -72, constant 20. Afterwards the whole image was monochromized. A high resolution (1200  $\times$  1200 dpi) output device was used for printing.

**Results****Specificity of rabbit anti-platelet antiserum**

Platelets have activation receptors pertaining to highly conserved protein families; for example, there is a 79% homology between human and mouse gpIIIa,<sup>40</sup> and a 70% homology between human and mouse E-selectin.<sup>41</sup> We, therefore, decided to test the capacity of the anti-mouse-platelet IgGs to react with human platelets *in vitro*, and the potential of heterologous antibodies to produce thrombocytopenia and bleeding *in vivo*. Anti-human-platelet and anti-mouse-platelet rabbit sera were tested by ELISA using human platelet proteins as antigen. Although anti-human-platelet rabbit serum showed a higher reactivity (O.D. = 2.470), anti-mouse-platelet rabbit serum also showed high reactivity (O.D. = 1.485); pre-immune serum did not react (O.D. = 0.161).

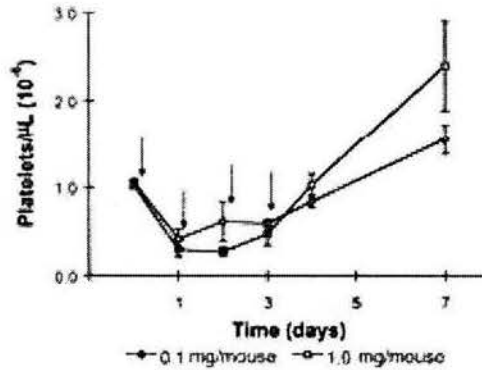
**Immune thrombocytopenia in Balb/c mice**

To induce immune thrombocytopenia, anti-human and anti-mouse platelet immunoglobulins were injected intraperitoneally into male mice. Polyclonal antibodies were used since AITP patients are known to have a mixture of autoantibodies with different reactivities.<sup>14</sup> When anti-mouse-platelet IgG were injected, at the three different doses used, thrombocytopenia was detected in all mice 1 day after injection, and all mice recovered normal platelet counts after 3 days (Figure 1A). Thrombocytopenia was also induced when anti-human-platelet IgG was injected (Figure 1B) but only with the higher doses, the low dose (0.1 mg/mouse) having no effect. No statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) were obtained for platelet counts among mice injected with anti-mouse-platelet IgG (0.1, 0.5 or 1.0 mg/mouse) and mice injected with anti-human-platelet IgG (0.5 or 1.0 mg) on the first day



**Figure 1.** Thrombocytopenia development caused by a single dose of rabbit anti-platelet purified IgG. Mice received 0.1, 0.5 or 1.0 mg/mouse of purified IgG intraperitoneally in 100 mL sterile PBS. Platelet counts were determined at the indicated times, using an automatic cell counter. (A) Anti-mouse platelet IgG. (B) Anti-human platelet IgG. (C) Control IgG. Results are shown as mean platelet count  $\pm$  standard error for groups of 3 mice each; in all cases when the mean platelet count was low the 3 mice in the corresponding group presented thrombocytopenia. Empty symbols correspond to groups of mice without bleeding signs; filled symbols correspond to groups of mice presenting signs of bleeding.

after treatment. In contrast, control IgG did not cause thrombocytopenia but a slight thrombocytosis was observed in all mice: platelet counts increased 29% on the first day, and 52% ( $p < 0.05$ ) by the third day after treatment (Figure 1C). Outstandingly, there was no correlation between platelet levels and hemorrhagic signs: bleeding depended on antibody dose used regardless of



**Figure 2.** Thrombocytopenia development caused by repeated injections of antibody. Mice received 4 injections of 0.1 or 1.0 mg/mouse intraperitoneally in 100 mL sterile PBS, at the times indicated by vertical arrows. Platelets counts were determined at the indicated times, using an automatic cell counter. Results are shown as mean platelet counts  $\pm$  standard error for groups of 2 mice each. Empty symbols correspond to groups of mice without bleeding signs; filled symbols correspond to groups of mice presenting signs of bleeding.

platelet level. Mice injected with 0.1 mg anti-human-platelet IgG had neither thrombocytopenia nor bleeding signs. Mice injected with 0.1 mg anti-mouse-platelet IgG or 0.5 mg anti-human-platelet IgG had severe thrombocytopenia but did not show any signs of bleeding. In contrast, mice injected with 0.5 mg anti-mouse-platelet IgG or 1.0 mg anti-human-platelet IgG showed thrombocytopenia plus moderate hemorrhagic signs: petechiae in ears and feet. Furthermore, mice injected with 1.0 mg anti-mouse-platelet IgG showed platelet counts drops and intestinal bleeding was evident (blood in feces), as were ecchymoses on the head and ears, and hematomas on the retro-orbital plexus (at the site of puncture). On the 3<sup>rd</sup> day after injection, bleeding stopped in all mice. At all times studied, the prothrombin time<sup>42</sup> and activated partial thromboplastin time<sup>43</sup> were normal in all mice (*data not shown*).

Since injection of anti-platelet IgG caused thrombocytopenia on day 1 and mice were shown to recover by day 3, repeated injections of antibodies were applied every 24 hours for 4 consecutive days to maintain low platelet counts. Two doses of anti-mouse-platelet antibodies were used (0.1 and 1.0 mg/mouse). Both doses produced thrombocytopenia. Platelet counts were kept low during the first 3 days, but even though mice received the last injection on the 3<sup>rd</sup> day, platelet counts recovered to normal levels on day 4 ( $p < 0.10$ ) (Figure 2). Mice injected with 0.1 mg/mouse of anti-mouse platelet IgG did not present any external signs of hemorrhage while mice injected with the 1.0 mg/mouse

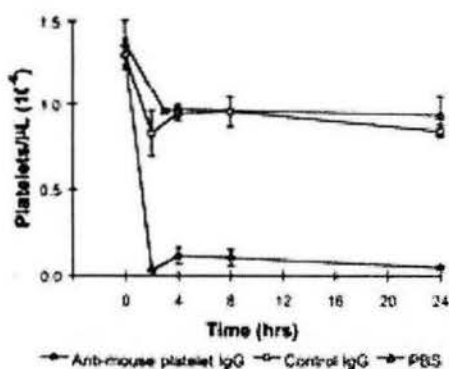


Figure 3. Early development of thrombocytopenia caused by a single dose of rabbit anti-mouse platelet purified IgG. Mice received 1.0 mg/mouse purified IgG intraperitoneally in 100  $\mu$ l sterile PBS. Negative control mice were injected with 1.0 mg/mouse of control IgG in 100  $\mu$ l sterile PBS or 100  $\mu$ l sterile PBS alone. Platelet counts were determined at the indicated times, using an automatic cell counter. Results are shown as mean platelet counts  $\pm$  standard error for groups of 3 mice each; in all cases when the mean platelet count was low the 3 mice in the corresponding group presented thrombocytopenia. Empty symbols correspond to groups of mice without bleeding signs; filled symbols correspond to groups of mice presenting signs of bleeding.

dose presented severe bleeding on the first day: hematomas, petechiae and ecchymoses. On the 2<sup>nd</sup> day, petechiae and ecchymoses disappeared, hematomas were smaller but external signs of intestinal bleeding appeared. On the 3<sup>rd</sup> day, only blood in feces was observed, and by the 4<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> days no signs of further bleeding were observed. As in the previous experiment, there was no correlation between platelet counts and hemorrhagic signs.

**Detailed thrombocytopenia kinetics, external and internal hemorrhagic signs**

To examine the relation between thrombocytopenia and bleeding more closely, mice received 1.0 mg/mouse of purified anti-mouse-platelet IgG; platelet counts and external and internal examinations of the mice were performed 0, 2, 4, 8, and 24 hrs after injection. The number of circulating platelets decreased within the first 2 hrs, and remained at an average of 6% of its normal level for 24 hrs after anti-platelet IgG injection (Figure 3). Circulating platelets in mice injected with the same amount of control IgG also decreased but only an

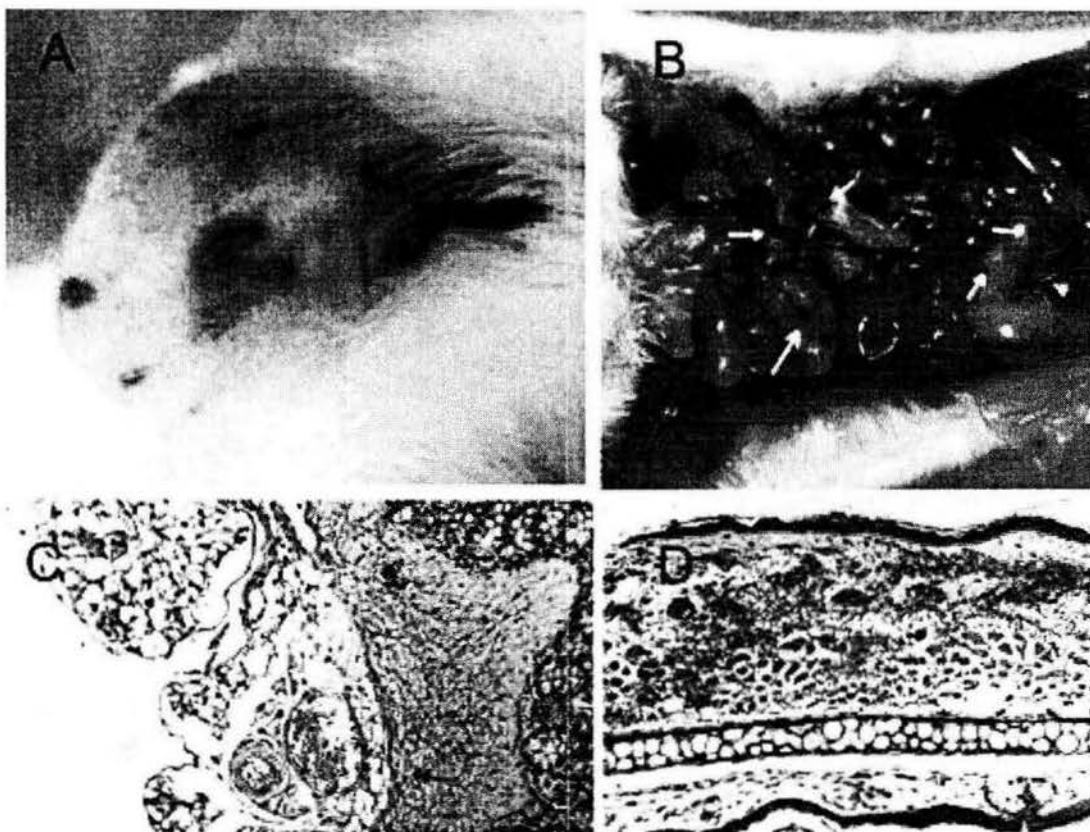


Figure 4. External and internal bleeding signs. Mice received a single dose of 1 mg/mouse of anti-mouse platelet IgG and were examined 4 hrs after IgG injection. A) Ear with external petechiae and ecchymoses. B) Ecchymoses in stomach, gut and small intestine. C) Histological section of intestine, 4 hrs after anti-mouse-platelet IgG injection. Note vascular congestion without extravasation (40 $\times$ ). D) Histological section of an ear, 4 hrs after anti-mouse-platelet IgG injection. Note congestion and extravasation (10 $\times$ ).

**Table 1. Early kinetics of bleeding in the mice.**

	Head	Legs	External bleeding			Liver	Kidney	Gut	Small intestine	Heart	Lung	Internal bleeding		Stomach
			Ears	Tail							Fat tissue (sc)	Abdominal tissue (sc)		
<b>4 hrs</b>														
Petechiae		1*	2											
Ecchymoses			1											
Hematoma		1			2	1	1	1		1				
<b>8 hrs</b>		1	1	1									1	1
Petechiae														
Ecchymoses		1						1						
Hematoma		1						3	3	1	1	1	1	1
<b>24 hrs</b>	1	2	2								1	1	2	
Petechiae														
Ecchymoses								2					1	1
Hematoma		2						2				1		1

\*Number of mice out of 3 in each experimental group presenting the corresponding bleeding sign in the referred site.

average 31.5%. The same reduction in platelet levels was observed in mice injected with PBS. Mice injected with anti-platelet IgG had similar external signs of bleeding as those described above, as soon as 4 hrs after injection, and these signs were more apparent at 8 and 24 hrs after IgG injection (Figure 4A). External signs of intestinal bleeding were observed in one out of 3 mice examined 4 hrs after IgG injection, and in all six mice examined 8 and 24 hrs after anti-platelet injection. Internal signs of bleeding (Figure 4B) were also evident 4 and 8 hrs after IgG injection: hematomas were observed in several organs (intestine, lungs, heart, liver, and kidney) of some mice. Internal hemorrhagic signs persisted 24 hrs after anti-platelet IgG injection (Table 1).

### Histopathology

Microscopic evaluation of paraffin-embedded tissue sections of organs revealed incipient congestion 2 hrs after treatment, and moderate to severe congestion at later times. Skin, kidney, liver, gut, small intestine, lungs and stomach presented hemorrhagic foci 4, 8 and 24 hours after IgG injection (Figures 4C, D). No inflammation around blood vessels was observed at any time in any section studied. Sections from mice injected with control IgG did not show anomalies.

### Evidence of anti-platelet IgG binding to endothelial cells

The hypothesis that the binding of anti-platelet antibodies to endothelial cells is involved in bleeding was tested by immunohistochemistry because: 1) there was no correlation between platelet counts and hemorrhage, 2) animals treated with

higher doses of anti-platelet antibodies showed more bleeding manifestations, and 3) no perivascular inflammatory response was observed. Besides, it is well known that endothelial cells bear glycoprotein molecules on their surface membrane similar to some glycoproteins on platelet membranes; thus, anti-platelet IgG could contain antibodies that bind to endothelium. Cryostat sections of fresh frozen liver incubated with anti-mouse-platelet IgG showed that anti-platelet IgG did in fact bind only to endothelial cells, while hepatic cells did not react with this IgG. Control IgG did not bind to endothelial cells or to hepatic cells (Figure 5).

### Discussion

Our results demonstrate immunologic cross-reactivity between anti-mouse-platelet IgG and human platelets *in vitro*. Moreover anti-human-platelet IgG caused thrombocytopenia and moderate bleeding in mice *in vivo*, this possibly as a result of the known similarities between mouse and human gpIb-IIIa,<sup>40</sup> gpIb-V-IX, and between other proteins such as CD40, P-selectin and E-selectin.<sup>41</sup> Both *in vitro* and *in vivo* the amount of anti-platelet IgG (Figure 1) required to react with the homologous platelet antigens was less than the quantity required to react with the heterologous platelet antigens, as expected for non-identical proteins and/or because of the presence of non-shared proteins in human and mouse platelets.

This experiment murine model also reproduced the external hemorrhagic signs observed in AITP patients. Internal bleeding was detected in many organs and external signs of intestinal bleeding occurred in mice injected with the highest dose of



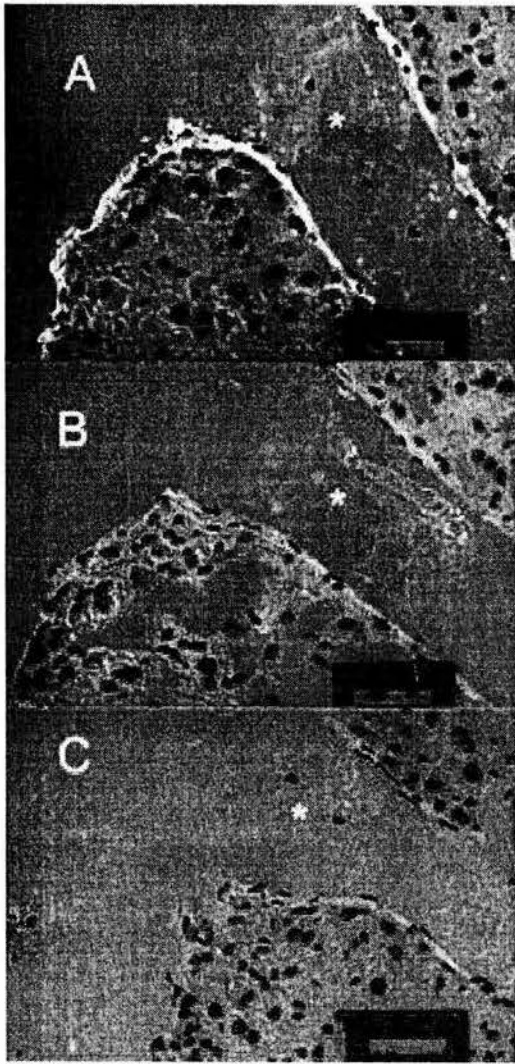


Figure 5. Immunohistochemistry showing anti-platelet antibodies bound to endothelial cells in fresh-frozen liver sections using as the second antibody, anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase, developed with diaminobenzidine. A) Anti-mouse platelet IgG. B) Control IgG. C) PBS. Asterisk indicates vessel lumen.

homologous anti-platelet IgG. A delay was observed between thrombocytopenia, which occurred 2 hrs after anti-mouse platelet IgG injection, and external or internal bleeding, which took place only 4 hrs after anti-platelet IgG injection.

Interestingly, external signs of hemorrhage appeared only in thrombocytopenic mice injected with the medium or high doses of anti-platelet IgG, but not in similarly thrombocytopenic mice injected with a low dose. This lack of correlation shows that low platelet counts by themselves do not explain

bleeding, and suggests an additional mechanism involving high doses of anti-platelet IgG. Given the possibility that antibody excess could form soluble immune complexes, as suggested by Nieswandt *et al.*,<sup>37</sup> we microscopically examined histological sections but did not find any inflammatory reactions in or around the blood vessels at 4, 8 or 24 hrs after antibody injection.

Traditionally, AITP has been classified as an organ-specific autoimmune disease, and thrombocytopenia has been considered sufficient to explain bleeding.<sup>1,2</sup> However, we found that the anti-platelet IgG employed also bind to endothelial cells, as expected because platelets and endothelium share many proteins.<sup>19-25</sup> Nakajima *et al.*<sup>44</sup> also demonstrated that an anti-gpIb-IIIa monoclonal antibody specifically binds to human umbilical vein endothelial cells with a high dissociation constant ( $K_d$  40.2 nM). On the other hand, Rodríguez-Calvillo *et al.*<sup>45</sup> obtained a monoclonal antibody against a single endothelial protein of 35 kDa which produced thrombocytopenia and bleeding in mice. Excess anti-platelet antibodies bound to endothelial cells could activate the cytoskeleton, disrupting endothelial junctions and allowing extravasation, and could also interfere with the anticoagulant-procoagulant hemostatic equilibrium.<sup>46,47</sup> Further investigation is required to elucidate the precise participation of these mechanisms in AITP. Our hypothesis is in accordance with other previous suggestions and information. Koenig *et al.*<sup>48</sup> found that one of three patients with immune thrombocytopenic purpura had autoantibodies reacting with a cryptic endothelial antigen. In systemic lupus erythematosus, anti-endothelial autoantibodies have been described as possible mediators of antibody-dependent endothelial cell damage.<sup>49-51</sup> Endothelial activation and damage by anti-platelet antibodies reacting with protein targets of endothelial cells has also been described by Hashemi *et al.*<sup>52</sup> and Glynn *et al.*<sup>53</sup>

AITP is often a chronic disease<sup>1-3</sup> because of a continuous production of autoantibody, but in our model all mice receiving a single anti-platelet injection recovered normal platelet counts and no external hemorrhagic signs were observed three days after treatment. Nieswandt *et al.*<sup>36</sup> produced thrombocytopenia that lasted 3-4 days, using a single dose of monoclonal antibodies; when this single dose was divided to simulate a continuous process, the thrombocytopenia lasted the same time. In our study, in an attempt to mimic the chronic disease, mice were injected every 24 hours for 4 consecutive days. Although thrombocytopenia was extended for 2 days more, unexpectedly, one day after the last boost, platelet counts returned to normal and every sign of hemorrhage disappeared (Figure 2). The possible explanations for this remission of thrombocytopenia and bleed-

ing could be: a) increased platelet destruction is accompanied by a compensatory increase in platelet production by megakaryocytes, as observed in AITP patients;<sup>54</sup> b) xenoantibodies bound to platelets are being removed from blood circulation;<sup>28</sup> c) anti-platelet IgG clearance interrupts activation of endothelial cells. On the other hand, the total IgG fraction used in the experiment contains, in addition to the anti-platelet antibodies responsible for the thrombocytopenia, non-specific IgG that is known to prevent platelet phagocytosis by macrophages, thus inducing remission in AITP patients.<sup>2,34,35</sup> In fact, we observed thrombocytosis when control IgG was used, and also following the thrombocytopenic episode 7 days after the mice had received 1 or 4 doses of anti-mouse-platelet IgG. This set of observations is in agreement with the clinical success of infusion of high-dose intravenous immune globulin G (IVIgG).<sup>2</sup>

## References

- George JN, el-Harake MA, Raskob GE. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1994;331:1207-11.
- George JN, Woolf SH, Raskob GE, Wasser JS, Aledort LM, Bailem PJ, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 1996;88:3-40.
- Frederiksen H, Schmidt K. The incidence of idiopathic purpura in adults increase with age. *Blood* 1999;94:909-13.
- Alves-Rosa F, Stanganelli C, Cabrera J, van Rooijen N, Palermo MS, Isturiz Ma. Treatment with liposome-encapsulated clodronate as a new strategic approach in the management of immune thrombocytopenic in a mouse model. *Blood* 2000;96:2834-40.
- Hou M, Stockelberg D, Kutti J, Wadenvik H. Antibodies against platelet GPIb/IX, GPIIb/IIIa, and other platelet antigens in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 1995;55:307-14.
- Kosugi S, Tomiyama Y, Shiraga M, Kashiwagi H, Mizutani H, Kanakura Y, et al. Platelet-associated anti glycoprotein GP IIb-IIIa autoantibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura mainly recognize cation-dependent conformations: comparison with the epitopes of serum antibodies. *Thromb Haemost* 1996;75:339-45.
- Kiefel V, Freitag E, Kroll H, Santoso S, Mueller-Eckhardt C. (1996) Platelet autoantibodies (IgG, IgM, IgA) against glycoproteins IIb/IIIa and Ib/IX in patients with thrombocytopenia. *Ann Hematol* 1996;72:280-5.
- Hou M, Stockelberg D, Kutti J, Wadenvik H. Immunoglobulins targeting both gplIb/IIIa and gplb/IX in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP): evidence for at least two different IgG antibodies. *Br J Haematol* 1997; 98:64-7.
- Hurlimann-Forster M, Steiner B, von Felten A. Quantitation of platelet-specific autoantibodies in platelet eluates of ITP patients measured by novel ELISA using the purified glycoprotein complexes gplIb/IIIa and gplb/IX as antigens. *Br J Haematol* 1997;98:328-35.
- Wang ZY, Shen ZX. Megakaryocytes and platelets in immune thrombocytopenic purpura. *Baillieres Clin Hematol* 1997;10:89-107.
- Kosugi S, Tomiyama Y, Honda S, Kashiwagi H, Shiraga M, Tadokoro S, et al. Anti-aVb3 antibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* 2001;85:36-41.
- Pfueller SL, David R, Firkin BG, Bilston RA, Cortizo WF, Raines G. Platelet aggregating IgG antibody to platelet surface glycoproteins associated with thrombosis and thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1990;74:336-41.
- Bierling P, Bettaieb A, Fromont P, Favrin M, Duedari N. Anti-GMP140 (CD62) autoantibody in a patient with autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1994;87:631-3.
- Gevorkian G, Manoutcharian K, Almagro JC, Govezensky T, Dominguez V. Identification of autoimmune thrombocytopenic purpura-related epitopes using phage-display peptide library. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;86:305-9.
- Gevorkian G, Manoutcharian K, Govezensky T, Cano JA, Dominguez V, Santamaria H, et al. Identification of mimotopes of platelet autoantigens associated with autoimmune thrombocytopenic purpura. *J Autoimmunity* 2000;15:33-40.
- Fischer P, Jendreyko N, Hoffmann M, Lerch H, Uttenreuther-Fischer MM, Chen PP, et al. Platelet-reactive IgG antibodies cloned by phage display and panning with IVIG from three patients with autoimmune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1999;105:626-40.
- Kallianpur A, Jordan J, Brandt S. The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. *Blood* 1994;83:1200-8.
- Bhattacharya V, McSweeney PA, Shi Q, Bruno B, Ishida A, Nash R, et al. Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34+ bone marrow cells. *Blood* 2000;95:581-5.
- Okada Y, Copeland BR, Hamann GF, Koziol JA, Cheresh DA, del Zoppo GJ. Integrin aVb3 is expressed in selected microvessels after cerebral ischemia. *Am J Pathol* 1996; 149:37-44.
- Byzova TV, Rabbani R, D'Souza S, Plow EF. Role of aVb3 in vascular biology. *Thromb Haemost* 1998;80:726-34.
- Rajagopalan V, Essex DW, Shapiro SS, Konkle BA. Tumor necrosis factor- $\alpha$  modulation of glycoprotein Iba expression in human endothelial and erythroleukemia cells. *Blood* 1992;80:153-61.
- Beacham DA, Lian J, Wu G, Konkle BA, Ludlow LB, Shapiro SS. Arterial shear stress stimulates surface expression of the endothelial glycoprotein Ib complex. *J Cell Biochem* 1999;73:508-21.
- Bombeli T, Schwartz BR, Harian JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a gplIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1),  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin, and gplb/IIIa. *J Exp Med* 1998;187:329-39.
- Yang J, Furie BC, Furie B. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: Its role as a selectin counterreceptor in leucocyte-endothelial and leucocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost* 1999;81:1-7.
- Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroccek R. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood* 2001;98:1047-54.
- Andre P, Denis CV, Ware J, Saffaripour S, Hynes RO, Ruggeri ZM, et al. Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. *Blood* 2000;96:3322-8.
- Yeh C, Wang WC, Hsieh TT, Huang TF, Agkistin, a snake venom-derived glycoprotein Ib antagonist, disrupts von-Willebrand factor-endothelial cell interaction and inhibits angiogenesis. *J Biol Chem* 2000;275:18615-8.
- Ishihara T, Akizuki S, Yokota T, Takahashi M, Uchino F, Matsumoto N. Foamy cells associated with platelet phagocytosis. *Am J Pathol* 1984;114:104-11.
- Mizutani H, Furubayashi T, Imai Y, Kashiwagi H, Honda S, Take H, et al. Mechanisms of corticosteroid action in immune thrombocytopenic purpura (ITP) experimental studies using ITP-prone mice, (NZW x BXSb) F1. *Blood* 1992;79:942-7.
- Mizutani H, Furubayashi T, Kashiwagi H, Honda S, Take H, Kurata Y, et al. Effects of splenectomy on immune thrombocytopenic purpura in (NZW x BXSb) F1 mice: analyses of platelet kinetics and anti-platelet antibody production. *Thromb Haemost* 1992;67:563-6.
- Nemoto K, Mae T, Saiga K, Matsuura E, Koike T. Autoimmune-prone (NZW x BXSb) F1 mice escape severe thrombocytopenia after treatment with deoxispergualin, an immunosuppressant. *Br J Haematol* 1995;91:691-6.
- McKenzie SE, Taylor SM, Malladi P, Yuhan H, Cassel DL, Chien P, et al. The role of the human Fc receptor Fc gamma RIIa in

## **RESULTADOS ADICIONALES**

Ya se sabía que en el suero de los pacientes con PTA hay anticuerpos que reconocen los péptidos sintéticos PV-2 y PV-3 de la integrina beta (Domínguez, 1998 tesis), pero no se sabía si estos anticuerpos participan en la fisiopatogenia del sangrado. Fue necesario preparar estos péptidos por un método manual de síntesis en fase sólida usando una estrategia N<sup>α</sup>-tert-Boc (Domínguez, *et al.*, 1998).

Una vez purificados los péptidos se procedió a la preparación del suero hiperinmune

### **SUERO HIPERINMUNE DE CONEJO ANTI-PEPTIDOS**

La preparación del suero hiperinmune anti-PV-2 y anti-PV-3 se realizó en conejos hembra *New Zealand* como se menciona en Domínguez, *et al.*, 1998.

En forma resumida, la administración de 100 µg de los péptidos se realizó por vía intraperitoneal en dos conejos por péptido. El péptido en solución en 1 mL de amortiguador de fosfatos (PBS pH 7.4) se emulsionó con 1 mL de adyuvante de Freund, completo para la primera dosis e incompleto para las siguientes tres dosis. Los péptidos se aplicaron cada dos semanas. Se tomó una muestra de sangre antes de la primera aplicación (Preinmune) y antes de cada una de las siguientes dosis (2a., 4a., y 6a. semanas). Se separó el suero para investigar la producción del anticuerpo correspondiente.

El monitoreo de la producción de anticuerpos se realizó por una técnica de micro ELISA en la que el péptido correspondiente se fijó a los pozos de una placa de plástico. Después se incubó con una dilución del suero para permitir que el anticuerpo se fije al antígeno.

Después de lavar el exceso de inmunoglobulinas que no reaccionaron, se incubó con un anticuerpo anti-IgG de conejo marcada con la enzima fosfatasa alcalina. Se reveló la

reacción con el sustrato correspondiente y se leyó la densidad óptica del compuesto colorido. En la tabla siguiente se presentan los resultados de las densidades ópticas obtenidas en la placa del ensayo de micro ELISA.

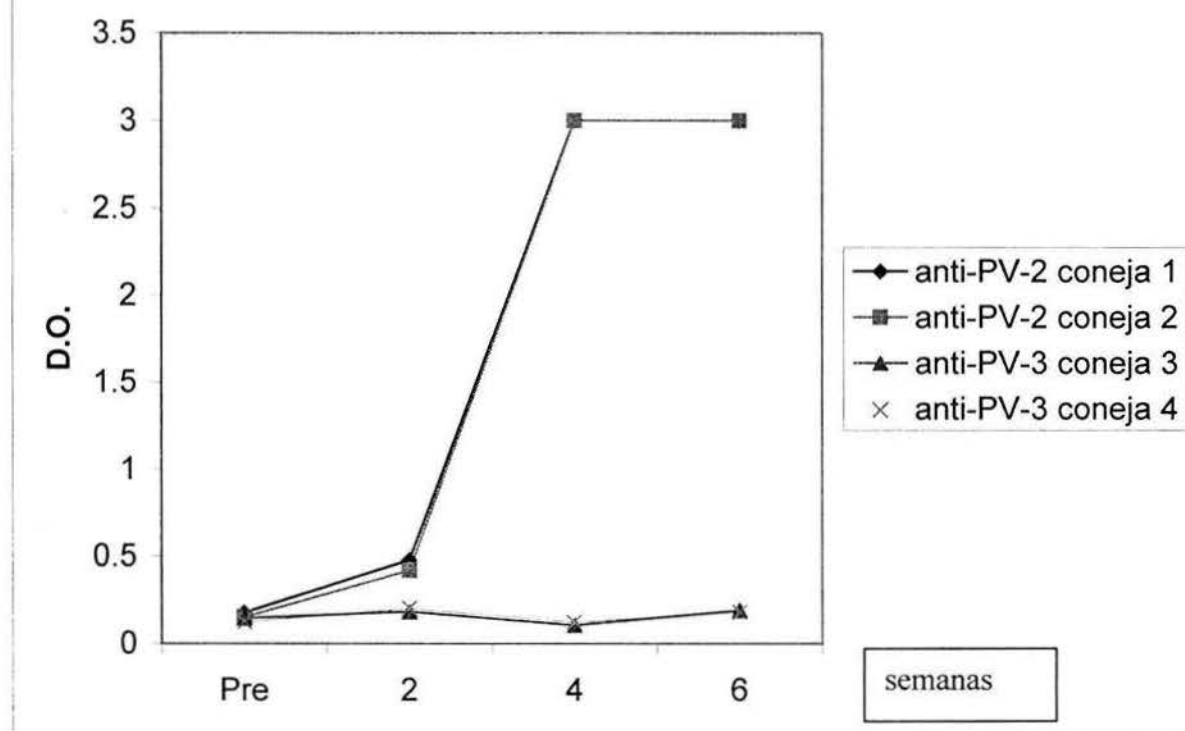
### Producción de suero hiperinmune anti-péptidos

	anti-PV-2	anti-PV-2	anti-PV-3	anti-PV-3
	conejo 1	conejo 2	conejo 3	conejo 4
Preinmune	0.177	0.152	0.147	0.126
2ª semana	0.477	0.418	0.184	0.201
4ª semana	3	3	0.105	0.124
6ª semana	3	3	0.19	0.181

Y en el gráfico siguiente se aprecia mejor la producción exitosa del anticuerpo anti-PV-2.

Se puede observar claramente que no fue posible producir anticuerpos anti-PV-3.

## Producción de suero hiperinmune



El suero hiperinmune anti-PV-2 se obtuvo después de la 6ª semana tomando una muestra de 45 mL de sangre de cada conejo. Las inmunoglobulinas G se purificaron por adsorción en columna de sefarosa-Proteína A (Domínguez, *et al.*, 2003).

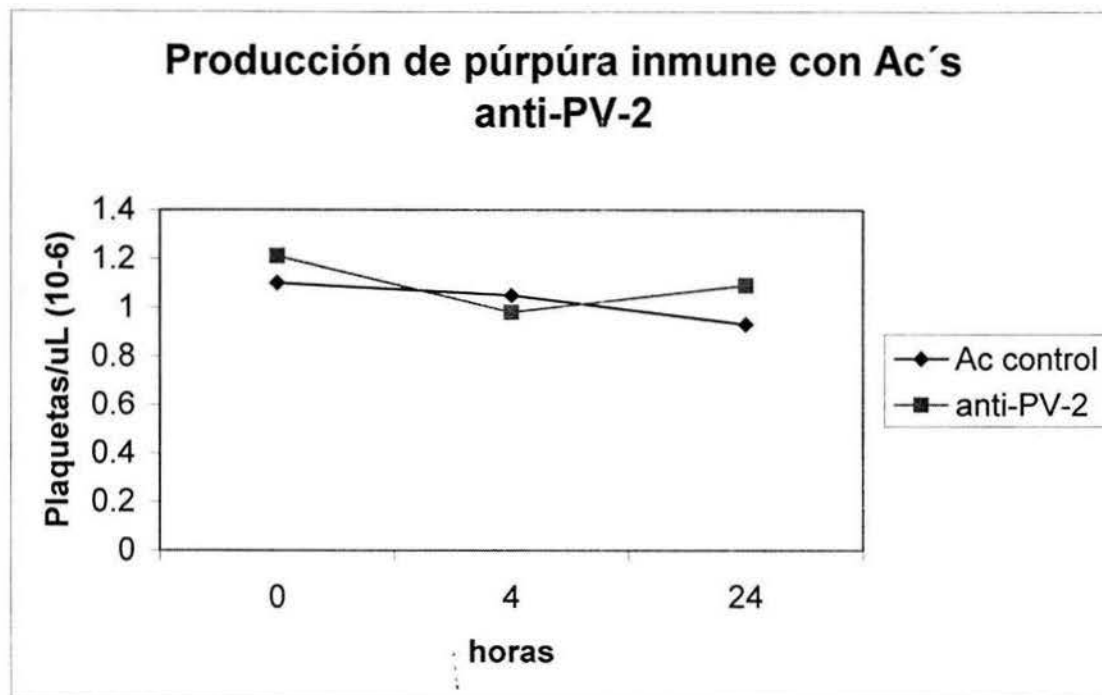
## **PRODUCCIÓN DE PURPURA INMUNE CON LA ADMINISTRACION DE ANTICUERPOS ANTI-PV-2**

Una vez obtenida la fracción de IgG's conteniendo los anticuerpos anti-PV-2, se administró a ratones Balb/c macho de 8 semanas de edad. La administración se realizó en forma intraperitoneal con una dosis de 1 mg/ratón. Esta dosis fue la misma que se usó para modelar la púrpura inmune con IgG's anti-plaquetas de ratón (Domínguez, *et al.*, 2003). Se obtuvo una muestra de sangre por punción capilar del plexo orbital para realizar la cuenta de plaquetas. Se tomó una muestra antes de la administración de las IgG's (0 horas) y a las 4 y 24 horas posteriores.

En la tabla siguiente se presenta el promedio de la cuenta de plaquetas (no. de plaquetas por  $\mu\text{L} \times 10^{-6}$ ) de tres ratones con cada fracción de IgG's empleada (IgG's control y las IgG's anti-PV-2).

	IgG's control	Ac. Anti-PV-2
0 horas	1.1	1.21
4 horas	1.05	0.98
24 horas	0.93	1.09

En el gráfico siguiente se aprecia mejor que no fue posible producir trombocitopenia y tampoco pudo observarse ningún signo hemorrágico en ninguno de los ratones.



Estos resultados claramente demostraron que no fue posible la producción de anticuerpos anti-PV-3 y que los anticuerpos anti-PV-2 no fueron capaces de producir púrpura trombocitopénica en el modelo murino. Pero tampoco descartan la posibilidad de que estén involucrados en la púrpura de los pacientes. Se debe recordar que el modelo murino es un modelo de púrpura inmune pero de ninguna manera autoinmune, como ocurre con los pacientes con PTA.

## RESULTADOS COLATERALES

---

Alrededor del 30% de los pacientes VIH+, con y sin SIDA, cursan con PTA secundaria.

Las manifestaciones hemorrágicas son similares a las de los pacientes con PTA primaria.

Al investigar si estos pacientes tenían en su suero anticuerpos que reconocieran los péptidos

sintéticos que reconocieron los anticuerpos de los pacientes con PTA, se encontró que

efectivamente había tales anticuerpos. Además se observó que, había anticuerpos que en

forma especial reconocían el péptido del dominio intracitoplasmático de la integrina beta3.

Esta reactividad fue debida a una homología antigénica con la proteína gp41 del VIH.

Este artículo describe como se demostró la homología antigénica de una región de ambas proteínas.

1. **Domínguez V**, Gevorkian G, Govezensky T, Rodríguez H, Viveros M, Cocho G, Macotella Y, Maso F, Pacheco M, Estrada JL, Lavalle C, Larralde C. Antigenic Homology of HIV-1 GP41 and Human Platelet Glycoprotein GPIIIa (Integrin  $\beta$ 3). *J Aq Immune Def Syn Hum Retrovir*. 1998; 17:385-90.



## Antigenic Homology of HIV-1 GP41 and Human Platelet Glycoprotein GPIIIa (Integrin $\beta_3$ )

\*Victoria Dominguez, \*Goar Gevorkian, \*Tzipe Govezensky, †Hector Rodriguez,  
\*Monica Viveros, ‡Germinal Cocho, \*Yazmin Macotela, §Felipe Masso, ||Manuel Pacheco,  
||Jose L. Estrada, ||Carlos Lavalle, and \*Carlos Larralde

\*Instituto de Investigaciones Biomedicas, Universidad Nacional Autonoma de Mexico; †Banco Central de Sangre, Centro Medico Nacional S.XXI, IMSS, Mexico; ‡Instituto de Fisica, Universidad Nacional Autonoma de Mexico; §Instituto Nacional de Cardiologia, Mexico; ||Hospital de Infectologia, Centro Medico Nacional La Raza, IMSS, Mexico City, Mexico

---

**Summary:** Fifty-eight of 89 serum samples (65.17%) from HIV-1-infected individuals at various disease stages contain antibodies that react with a platelet peptide located in the cytoplasmic domain of integrin  $\beta_3$ , glycoprotein GPIIIa (aa749-761; sequence DRKEFAKFEEERA). Rabbit polyclonal antibodies raised against the synthetic platelet peptide also react with the structurally homologous HIV-1 gp41-derived peptide (EKNEQELLELDKW(A)) and bind to a Western blot band with molecular weight corresponding to HIV-1 gp41. These findings point to molecular mimicry between HIV-1 and a human membrane protein found in platelets and other cells that could be of pathologic consequence. **Key Words:** HIV—Molecular mimicry—Platelet glycoprotein GPIIIa—Integrin  $\beta_3$ .

---

Several examples of molecular mimicry between HIV-1 and human proteins have been reported in the literature; all are suspected of playing a role in the pathogenesis of AIDS by way of cross-reactivity of antiviral immune attack with self components. Thus, the similarity between the highly conserved homologous sequence located in the carboxy terminus of the HIV-1 gp41 (aa837-844) and the amino terminal of the beta chain of all human HLA class II antigens was identified (1) and related to immune dysfunction of CD4<sup>+</sup> T cells. A sequence homology between HIV-1 gp41 and interleukin 2 (IL-2) was also described and presumed to be a possible cause of the immunosuppressive activity of HIV-1 (2). Partial sequence homology between neuroleukin and the aa245-289 region of HIV-1 gp120 (3) was also related to AIDS dementia complex. Further, cross-reactivity of

anti-HIV-1 gp41 antibodies with human astrocytes (4,5) as well as molecular mimicry between HIV-1 gp120 V3 loop and human brain proteins (6) could lead to the central nervous system complications found in AIDS patients. A structural homology between gp120 and C1q was identified when antibodies raised against HIV-1 gp120 cross-reacted with C1q, and antibodies against C1q reacted with gp120 (7). Functional, as well as antigenic, homology between HIV-1 gp41 and complement factor H has been reported by Pinter et al. (8). Moreover, the ability of a mouse monoclonal antibody raised against HIV-1 p24 to bind to normal platelets from HIV-negative individuals (9) as well as the cross-reactivity of anti-HIV-1 gp 120 antibodies with a platelet surface glycoprotein GPIIIa (integrin  $\beta_3$ ) (10,11) are possible contributors to the development of immunologic thrombocytopenia in AIDS patients.

Here we report a new homology involving platelets' integrin  $\beta_3$  and HIV-1 gp41. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based screening of sera from HIV-1-positive individuals with scrambled peptides from human platelets, HIV-1, and the parasite *Taenia crassiceps*,

---

Address correspondence and reprint requests to G. Gevorkian, Instituto de Investigaciones Biomedicas, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico D.F., MEXICO.

Manuscript received February 18, 1997; accepted November 13, 1997.

revealed that a significant number (58 of 89) contained antibodies reactive with a synthetic peptide (platelet virus-like sequence [PVLS]; aa749-761; sequence: DRKEFAKFEERA) from the cytoplasmic domain of the platelets' integrin  $\beta_3$ , which functions as a receptor for several soluble adhesive proteins (12) and is involved in blood clotting. Comparisons of amino acid sequence and structural features between PVLS and HIV-1 proteins pointed to a structurally homologous sequence in HIV-1 gp41 (virus platelet-like sequence [VPLS]; aa655-667: EKNEQELLELDKW), which is related to the viral-mediated cell-cell fusion (13). Finding that antibodies to VPLS cross react with platelet PVLS implies their potential obstructive role in the proper function of platelets and of any other cell, containing integrin  $\beta_3$  in their membranes, such as megakaryocytes and astrocytes.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents

N<sup>o</sup>-tert-Butyloxycarbonyl (BOC)-protected amino acids were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.). All other chemicals for peptide synthesis were obtained from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, U.S.A.) and were the purest grade available. Alkaline phosphatase-conjugated anti-human and anti-rabbit IgG (whole molecule), p-nitrophenyl phosphate disodium (5 mg/tablet), and bovine serum albumin were purchased from Sigma.

### Synthetic Peptides

The peptides PVLS (DRKEFAKFEERA), PV-2 (KKFDREPYMTENTC), PV-3 (GCPQEKEKSFTIKP), PV-4 (CSDEALPLGSPRCDLK) from platelets' integrin  $\beta_3$ , and VPLS (EKNEQELLELDKW(A)) from HIV-1 gp41 were prepared manually by stepwise solid-phase synthesis using N<sup>o</sup>-tert-BOC strategy (14). On completion of the solid-phase part of the synthesis the removal of all side-chain protecting groups (NW-mesitylene-2-sulphonyl- for arginine; benzyl- for aspartic and glutamic acids; 2-chloro-benzyloxycarbonyl- for lysine; formyl- for tryptophan) and simultaneous cleavage of the peptides from the resin were performed in the presence of trifluoromethanesulfonic acid. The crude peptides were purified on a column with Sephadex-25 (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) and the correct amino acid sequence of each peptide was confirmed by protein sequencing on a pulse liquid-phase protein sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.). Totally unrelated peptides GK-1 (GYYPSPDPNTFYAPPYSA) and GK-2 (KKMPYPYTGPPPVK) from an important antigenic protein of *T. crassiceps*, a parasitic cestode of mice (15), were also prepared by the same procedure and used as negative controls.

### Sera

The HIV-1-positive human sera used in this study were obtained from 89 patients at various stages of HIV-1 infection attending an outpatient clinic in Mexico (the La Raza Hospital of the Mexican Institute of Social Security, Mexico City, Mexico). All serum samples were verified to be positive in whole-virus ELISA and immunoblotting on initial testing.

67 serum samples from 36 patients with confirmed thrombocytopenia as well as control sera from 80 healthy, HIV-1-seronegative blood donors were obtained at Banco Central de Sangre, Centro Medico Nacional S.XXI, Mexico City, Mexico). Rabbit hyperimmune antiserum against PVLS was obtained by 6 subsequent subcutaneous injections of 1 mg of carrier free peptide in complete (for the first injection) and incomplete (for booster injections) Freund's adjuvant at 2-week intervals in New Zealand white female rabbits. Rabbit sera were obtained before the first immunization and two weeks after each injection. Some of the HIV-1-positive human sera and the rabbit hyperimmune serum were tested for their reactivity with human platelets in the whole platelet ELISA and the flow cytometric assay (16).

### ELISA Tests

All ELISA tests were performed following standard laboratory procedures (17). Immulon 96-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with 100  $\mu$ l of PVLS or VPLS, respectively, per well (50  $\mu$ g/ml). The peptides were diluted in carbonate-bicarbonate-buffered saline (0.2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 0.2M NaHCO<sub>3</sub>; pH 9.6). The plates were incubated at 37° C for 1 hour and were washed 4 times with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2) containing 0.3% Tween 20 (PBS-T). The wells were filled with 100  $\mu$ l of the serum sample to be tested (diluted 1:100 in PBS with 0.3% Tween and 1% bovine serum albumin [PBS-T-BSA]). The plates were left to incubate for 1 hour at 37° C. Afterward, the plates were washed 4 times with PBS-T, then a total of 100  $\mu$ l of the conjugate (anti-human or anti-rabbit immunoglobulin G coupled to alkaline phosphatase [1:2,000 or 1:10,000, respectively]) was added, and the plates were left to react at 37° C for 1 hour. The plates were again extensively washed as described. Afterward, 100  $\mu$ l of the substrate p-nitrophenyl-disodic phosphate (1 mg/ml) was added and the plates were incubated at 37° C for 1 hour before the reaction was stopped with 50  $\mu$ l of 2 N NaOH per well. The optical density (OD) was measured at a wavelength of 405 nm. To assess the specificity of the peptide reaction, 18 HIV-positive human sera were tested after preincubation with the corresponding peptide (10<sup>-5</sup>M) at 37° C for 1 hour, in the expectation of some degree of inhibition of the ELISA test in the case of specific binding to the peptide and none at all otherwise. Moreover, an ELISA inhibition curve was performed for the rabbit anti-PVLS serum with varying concentrations of the inhibiting peptide using the same preincubation procedure.

Seven control HIV-1-negative sera were used in each assay as an internal negative standard. Reactions greater than the mean absorbance + 3 standard deviations (SD) recorded for these 7 control sera were regarded as positive.

### Western Blot

Serum samples were obtained from peptide immunized rabbits before the first immunization and 2 weeks after the third boosting injection. A commercially available HIV-1 Western blot kit (Organon Teknica Corporation, Durham, NC, U.S.A.) was used according to standard protocol.

## RESULTS

Serum antibodies against the platelets' integrin  $\beta_3$  peptide, PVLS, and HIV-1 gp41 peptide, VPLS, were studied in 89 HIV-1-positive individuals and 80 HIV-1-negative blood donors. The frequency of detectable an-

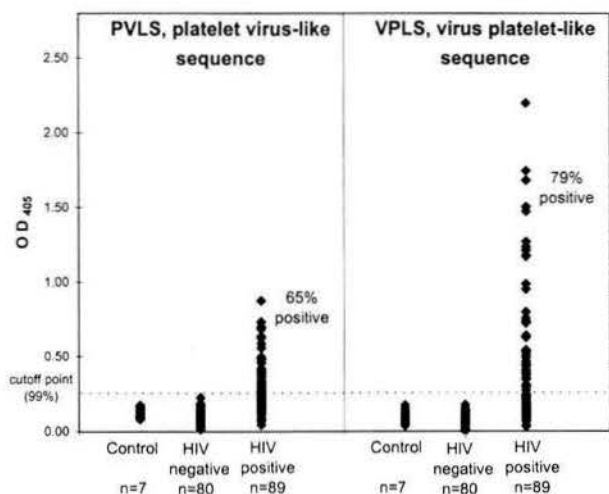


FIG. 1. Prevalence of anti-platelet virus-like sequence and anti-gp41 virus platelet-like sequence antibodies in HIV-1-positive sera as seen on enzyme-linked immunosorbent assay.

antibodies in HIV-1-positive sera was 65.17% (58 of 89) for PVLS and 78.65% (70 of 89) for VPLS (Fig. 1). From the 58 serum samples positive for PVLS, 54 were positive for VPLS as well, whereas of 70 serum samples positive for VPLS only 54 were reactive with PVLS. None of the 80 normal sera from healthy blood donors exhibited any anti-PVLS or VPLS antibodies.

Of the 58 patients positive for PVLS, 40 had normal platelet counts ( $>150 \times 10^9$  platelets/L), and only 18 patients had lower numbers of circulating platelets. The relation between the presence of serum anti-PVLS antibodies and platelet counts is shown in Figure 2. No statistically significant trend was detected nor any difference was observed in mean platelet counts between HIV-positive patients with and without anti-PVLS antibodies. None of the HIV-1-positive sera with anti-PVLS antibodies nor the rabbit anti-PVLS hyperimmune serum showed any reactivity with normal human platelets in the whole platelet ELISA and the flow cytometric assay (data not shown).

Sixteen sera randomly selected from the 89 HIV-1-positive samples were also tested with 3 other platelets' integrin  $\beta_3$  peptides (PV-2, PV-3, and PV-4) and two peptides, GK-1 and GK-2, from a protein of *T. crassiceps* (15). Although a few HIV-1-positive sera were reactive with other platelet peptides PV-2, PV-3, and/or PV-4, none showed any reactivity with GK-1 or GK-2 (Fig. 3).

To demonstrate serologic specificity of positive sera, as well as the cross-reactivity of PVLS and VPLS, an inhibition assay was performed in which the ELISA plates were coated with VPLS and sera were preincubated with PVLS ( $10^{-5}$  M). Various degrees of inhibition were detected in all 18 HIV-positive sera tested (Fig. 4).

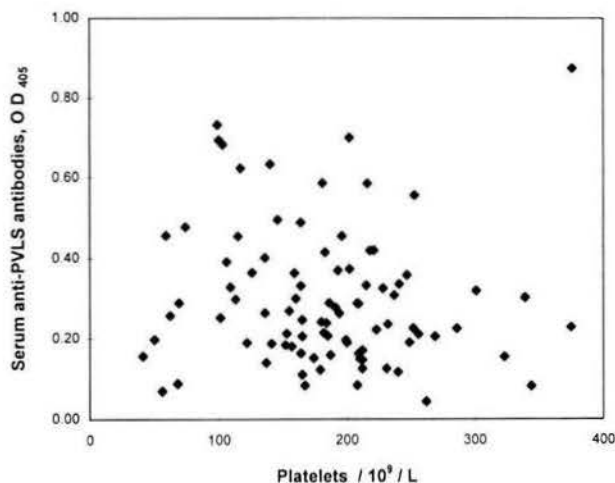


FIG. 2. Correlation between anti-PVLS antibodies and platelet counts in 89 HIV-1-infected individuals.

Similarly, hyperimmune rabbit antibodies raised against PVLS reacted strongly with VPLS in ELISA ( $OD = 0.86$ ) and was inhibited by preincubation with varying molar concentrations of PVLS in a concentration dependent stepwise fashion (Fig. 5). Western blot analysis showed that rabbit polyclonal antibodies raised against PVLS bound to a band of MW corresponding to HIV-1 gp41, as well as to other bands possibly corresponding to nonviral but host cellular proteins (Fig. 6).

## DISCUSSION

The presence in human platelet eluates of an antibody that reacted with a chemically unidentified common epitope on platelets' integrin  $\beta_3$  and HIV-1 gp120 was found earlier by Bettaieb et al. (10,11). These authors demonstrated that this epitope was independent of the carbohydrate moieties of r-gp120 and suggested that its

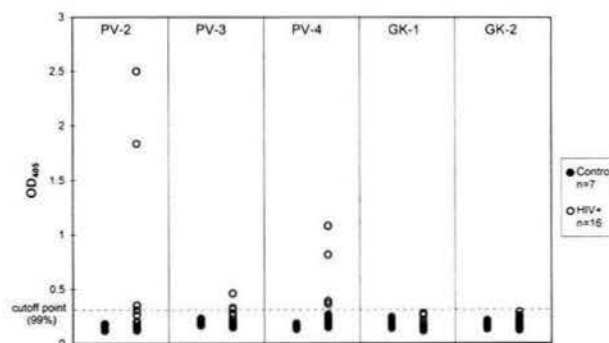
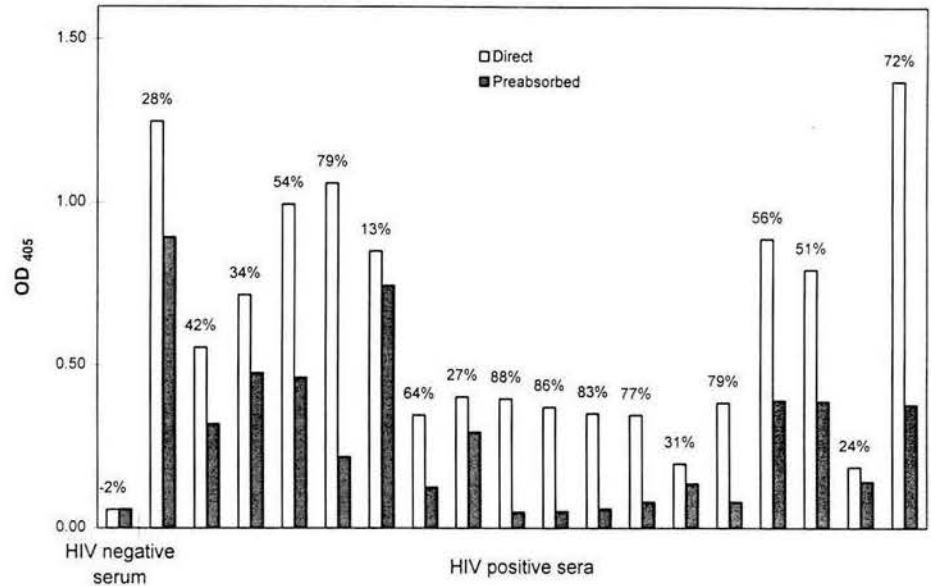


FIG. 3. Enzyme-linked immunosorbent assay absorbance values of sera from 16 HIV-1-positive and 7 HIV-1-negative individuals with three platelet (PV-2, PV-3 and PV-4) and two *Taenia crassiceps* (GK-1 and GK-2) peptides.

**FIG. 4.** Peptide inhibition of anti-virus platelet-like sequence enzyme-linked immunosorbent assay of human HIV-positive and HIV-negative sera.



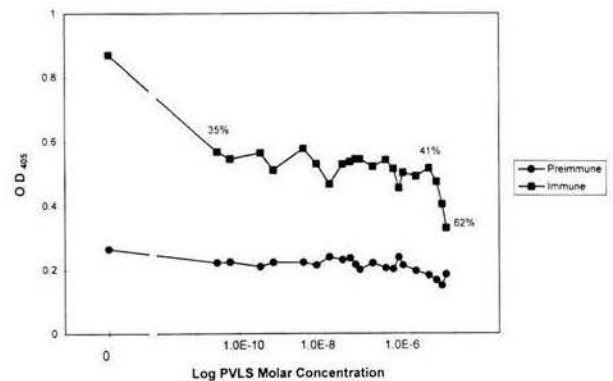
characterization would be possible by using synthetic peptides. However, their cross-reactive antibody did not recognize in ELISA any of the 34 synthetic peptides from gp120 they tested (11).

We report here that 58 of 89 HIV-1-positive serum samples contain antibodies cross-reactive with a synthetic peptide PVLS (aa749-761; sequence: DRKEFAK-FEEERA) from the cytoplasmic domain of platelets' integrin  $\beta_3$  whereas none of the HIV-1-negative control sera reacted with this peptide (Fig. 1). Other platelet peptides, also from integrin  $\beta_3$  (PV-2, PV-3, and PV-4), were reactive with fewer HIV-positive sera but none of the *T. crassiceps* peptides (GK-1 and GK-2) was reactive (Fig. 3).

Platelet pathology in HIV infection is well recognized: approximately 9% of HIV-infected non-AIDS patients and 21% of HIV-infected patients with AIDS develop an immunologic thrombocytopenia that is clinically similar to classic autoimmune thrombocytopenia (18-21). Perhaps PVLS-positive HIV-infected individuals develop autoimmune antiplatelet antibodies in response to HIV-mediated extensive cellular damage. However, because no correlation was found between anti-PVLS antibodies and platelet counts in 89 HIV-1-infected individuals tested, no causal relation for platelet autoimmunity is easily tenable without much speculation. Moreover, no platelet reactivity could be shown to be present in human HIV-1-positive sera nor in hyperimmune rabbit anti-PVLS serum, further weakening the notion of platelet autoimmunity directly due to the antipeptide antibodies. Thus, we searched for a possible antigenic homology

between integrin  $\beta_3$  and HIV-1 proteins to examine the possibility of cross-reactivity between the two glycoproteins. By simply contrasting amino acid sequences and biochemical and structural properties of short amino acid stretches, a 13-amino acid peptide (VPLS) structurally homologous to PVLS was located in the conserved region of HIV-1 gp41 (aa655-667). Both peptides have a large number of charged residues as well as a strong tendency to  $\alpha$ -helix structure, as predicted by Gibrat (22) or DPM (23) methods, or coil structure, as predicted by Levin (24) or SOPM (25) methods (Fig. 7).

Antigenic similarities between the two peptides were indeed found: 54 of 58 PVLS-positive serum samples were reactive with VPLS as well, and PVLS inhibited the reaction of VPLS with human HIV-positive sera. The



**FIG. 5.** Inhibition curve of rabbit polyclonal anti-PVLS sequence preimmune (negative control) and immune sera by various molar concentrations of soluble PVLS.

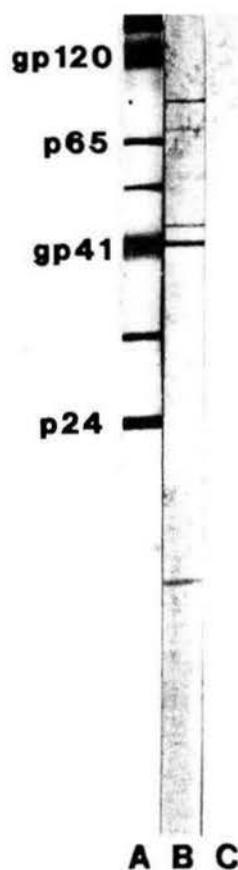


FIG. 6. Western blot demonstrates that rabbit anti-platelet virus-like (PVLS) sequence antibody binds to various proteins in a whole viral lysate, one with MW ~41,000 close to that of gp41 of HIV-1. Lane A, strong HIV-1-positive control human serum; lane B, rabbit anti-PVLS serum; lane C, rabbit preimmune serum.

different degrees of inhibition can be explained by different content and affinity profile of cross-reactive antibodies in individual serum samples for the two versions of the reacting peptides. Further, rabbit polyclonal antibodies raised against PVLS were shown to react with VPLS, and PVLS inhibited this reaction (Fig. 4). Additionally, Western Blot analysis showed that rabbit poly-

Method	PVLS	VPLS
	DRKEFAKFEERA	EKNEQELLELDKW
Gibrat	HHHHHHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHH
Levin	CCCCCCCCCCCCC	CCCCCCCCCCCCC
DPM	CCHHHHHHHHCC	TCCHHHHHHHCCC
SOPM	CCCCCCCCCCCCC	CCCCCCCCCCCCC
Consensus	CCCCCCCCCCCCC	CCCCCCCCCCCCC

FIG. 7. Secondary structure prediction using the methods of Gibrat (22), DPM (23), Levin (24), and SOPM (25). H, helix; C, coil.

clonal antibodies raised against PVLS bound to a band with MW corresponding to HIV-1 gp41 (Fig. 5). Moreover, these anti-PVLS antibodies bound to other seemingly nonviral proteins. As the Western blot strips were prepared using whole viral lysate, we would speculate that these nonviral bands come from host cells and that some of them could correspond to members of the integrin family, a collection of molecules with MW ranging from 95 to 210 kd (26).

Normal or close to normal platelet counts ( $>150 \times 10^9/L$ ) of PVLS- and/or VPLS-positive human serum samples from HIV-1-infected patients weakens the possible significance of these anti-peptide antibodies in platelet destruction. However, as VPLS forms a part of a fairly conserved region located near the membrane-spanning domain of HIV-1 gp41 that has been shown to inhibit the viral mediated cell-cell fusion (7), and PVLS is from a structurally and functionally conserved cytoplasmic domain of integrins, the presence of bivalent cross-reacting antibodies to the virus surface and cell membrane component proteins of many cells may contribute to diverse cytopathic phenomena as well as be of consequence in virus entrance and membrane fusion mechanisms, as has been shown for the peptides alone (13). Alternatively, establishing the functional significance of these and other peptide epitopes so frequently identified between seemingly unrelated partners may need more detailed systematic research and technologic development to probe more deeply in immune specificity and in cell differentiation and function.

**Acknowledgments:** This work was supported by grants from Direccion General de Asuntos del Personal Academico (DGAPA-UNAM, IN213194) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACyT, 5075-M9406). The authors thank Patricia N. Castillo for her assistance in human sera collection.

## REFERENCES

1. Golding H, Shearer GM, Hillman K, et al. Common epitope in human immunodeficiency virus (HIV) 1-GP41 and HLA Class II elicits immunosuppressive autoantibodies capable of contributing to immune dysfunction in HIV 1-infected individuals. *J Clin Invest* 1989;83:1430-5.
2. Reiher III WE, Blalock JE, Brunck TK. Sequence homology between acquired immunodeficiency syndrome virus envelope protein and interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:9188-92.
3. Lee MR, Ho DD, Gurney ME. Functional interaction and partial homology between human immunodeficiency virus and neuroleukin. *Science* 1987;237:1047-51.
4. Yamada M, Zurbriggen A, Oldstone MBA, Fujinami R. Common immunologic determinant between human immunodeficiency virus type 1 gp41 and astrocytes. *J Virol* 1991;65:1370-6.
5. Eddleston M, de la Torre JC, Xu JY, et al. Molecular mimicry accompanying hiv-1 infection: human monoclonal antibodies that

- bind to gp41 and to astrocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 10:939-44.
6. Trujillo JR, McLane MF, Lee TH, Essex M. Molecular mimicry between the human immunodeficiency virus type 1 gp 120 V3 loop and human brain proteins. *J Virol* 1993;67:7711-5.
  7. Stoiber H, Thielens NM, Ebenbichler C, Arlaud GJ, Dierich MP. The envelope glycoprotein of HIV-1 gp120 and human complement protein C1q bind to the same peptides derived from three different regions of gp41, the transmembrane glycoprotein of HIV-1, and share antigenic homology. *Eur J Immunol* 1994;24:294-300.
  8. Pinter C, Siccardi AG, Lopalco L, Longhi R, Clivio A. HIV glycoprotein 41 and complement factor H interact with each other and share functional as well as antigenic homology. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995;11:971-80.
  9. Hohmann AW, Booth K, Peters V, Gordon DL, Comacchio RM. Common epitope on HIV p24 and human platelets. *Lancet* 1993; 342:1274-5.
  10. Bettaieb A, Fromont P, Louache F, et al. Presence of cross-reactive antibody between human immunodeficiency virus (HIV) and platelet glycoproteins in HIV-related immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 1992;80:162-9.
  11. Bettaieb A, Oksenhendler E, Duedari N, Bierling P. Cross-reactive antibodies between HIV-gp120 and platelet gpIIb (CD61) in HIV-related immune thrombocytopenic purpura. *Clin Exp Immunol* 1996;103:19-23.
  12. Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 1991;65:359-362.
  13. Wild C, Greenwell T, Matthews T. A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993;9:1051-3.
  14. Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. 1. the synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc* 1963;85:2149-54.
  15. Gevorkian G, Manoutcharian K, Larralde C, et al. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol Lett* 1996;49:185-9.
  16. Stockelberg D, Hou M, Jacobsson S, Kutti J, Wadenvik H. Detection of platelet antibodies in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). A comparative study using flow cytometry, a whole platelet ELISA, and an antigen capture ELISA. *Eur J Haematol* 1996;56:72-7.
  17. Groome NP. Immunoassays of proteins and anti-peptide antibodies. In: Wisdom GB, ed. *Peptide antigens: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 1994:139-79.
  18. Ratner L. Human immunodeficiency virus-associated autoimmune thrombocytopenic purpura: a review. *Am J Med* 1989;86:194-8.
  19. Sloan EM, Klein HG, Banks SM. Epidemiology of thrombocytopenia in HIV infection. *Eur J Haematol* 1992;48:168-72.
  20. Karpatkin S, Nardi MA, Hymes KB. Sequestration of anti-platelet GPIIIa antibody in rheumatoid factor immune complexes of human immunodeficiency virus 1 thrombocytopenic patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2263-7.
  21. Zauli G, Catani L, Gibellini D, et al. Impaired survival of bone marrow GPIIb/IIIa+ megakaryocytic cells as an additional pathogenic mechanism of HIV-1-related thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1996;92:711-7.
  22. Gibrat JF, Garnier J, Robson B. Further developments of protein secondary structure prediction using information theory. *J Mol Biol* 1987;198:425-43.
  23. Deleage G, Roux B. An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Eng* 1987;1:289-94.
  24. Levin JM, Robson B, Garnier J. An algorithm for secondary structure determination in proteins based on sequence similarity. *FEBS Lett* 1986;205:303-8.
  25. Geourjon C, Deleage G. SOPM: a self-optimized method for protein secondary structure prediction. *Protein Eng* 1994;7:157-64.
  26. Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48:549-554.

## RESULTADOS COLATERALES

---

Una metodología, relativamente reciente, para investigar los epitopes de los anticuerpos es la metodología de bibliotecas de péptidos expresadas en un fago. Para este estudio se usó una biblioteca de péptidos de 7 aminoácidos expresados en el fago M13. Los sueros de dos pacientes con PTA crónica, activa y refractaria, seleccionaron algunos fagos, que después se probaron con otros sueros de pacientes con PTA. En este artículo se presentan las secuencias de los fagos seleccionados. También se presenta la ubicación de estas secuencias en proteínas de la membrana plaquetaria, lo que sugiere que estos pueden ser determinantes antigénicos involucrados en la destrucción de las plaquetas.

2. Gevorkian G, Manoutcharian K, Almagro JC, Govezensky T, **Dominguez V**. Identification of Autoimmune Thrombocytopenic Purpura-Related Epitopes Using Phage-Display Peptide Library. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998; 86:305-9.

## RAPID COMMUNICATION

# Identification of Autoimmune Thrombocytopenic Purpura-Related Epitopes Using Phage-Display Peptide Library

Goar Gevorkian, Karen Manoutcharian, Juan Carlos Almagro,\* Tzipe Govezensky, and Victoria Dominguez

*Instituto de Investigaciones Biomedicas and \*Instituto de Biotecnologia, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, C.P. 04510 Mexico, D.F. Mexico*

**A random heptapeptide phage-displayed library was screened with two serum samples from autoimmune thrombocytopenic purpura (AITP) patients to address the repertoire of autoantigenic epitopes involved in platelet destruction. We obtained a panel of affinity-selected phage clones that have been shown to react in enzyme-linked immunosorbent assay with autoantibodies from other AITP patients. None of the peptides obtained has been described previously as possibly being an epitope for antiplatelet antibodies, and the majority of them did not show any homology with known platelet glycoproteins. We conclude that peptides identified in this study could represent discontinuous epitopes or mimotopes of natural autoantigens. Also, they could be present in still-unknown proteins involved in AITP pathogenesis.** © 1998 Academic Press

**Key Words:** autoimmune thrombocytopenia; peptide phage library; autoantibodies.

### INTRODUCTION

Autoimmune thrombocytopenic purpura (AITP) is a common hematologic disorder caused by antiplatelet autoantibodies. A number of previous studies have addressed the repertoire of autoantigenic epitopes on platelets by analyzing the competitive binding between human autoantibodies and murine monoclonal antibodies or by using enzyme-cleaved fragments and synthetic peptides corresponding to different sequences of platelet proteins. With these techniques, several platelet autoantigens have been characterized, among which platelet-membrane glycoproteins (GP) Ib/IX and IIb/IIIa were encountered most frequently (1–8). Also, autoantibodies against other platelet glycoproteins, e.g., GPVI, GPIV, GPIa/IIa, certain internal platelet proteins (vimentin and desmin), and the platelet cytoskeleton protein vinculin, have been characterized (7, 9–11). More recently, antibodies specific for a novel autoantigen, a 30-kDa internal platelet pro-

tein, have been detected in 12 of 60 patients with AITP (12). In addition, the presence of platelet autoantibodies recognizing the granule membrane protein of 140 kDa (GMP140, CD62) has been reported (13). Thus, platelet autoantibodies appear to be heterogeneous, and relevant autoantigens cannot be identified in a number of cases.

Currently, the possibility of selecting ligands from large libraries of peptides with a random amino acid sequence has raised considerable interest, and phage-epitope library technology has become a powerful tool for identifying ligands for antibodies in sera whether or not the antigen is known (14–20). It has been shown that by screening phage libraries with monoclonal or polyclonal antibody, mimotopes that mimic linear, discontinuous, and even nonpeptidic epitopes of antigen can be obtained (21–23).

In the present study, we have chosen this new approach to identify peptides that bind to antiplatelet autoantibodies and, therefore, correspond to or mimic the epitopes of platelet autoantigens. By screening a heptapeptide phage library with two sera from AITP patients, we obtained a panel of affinity-selected phage clones that reacted in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with autoantibodies from other AITP patients.

Since several peptides specifically recognized by antiplatelet autoantibodies were identified, our results provide additional evidence that sera from AITP patients could contain a complex mixture of autoantibodies with a wide range of specificities for a number of autoantigens. This would be of interest in the context of understanding the mechanism(s) of platelet destruction as well as in the development of possible diagnostic and therapeutic agents for AITP.

### MATERIALS AND METHODS

**Human sera.** Sera from 15 chronic AITP patients and clinically healthy blood donors of both sexes were



TABLE 1

Peptide Sequences Displayed by 46 Random Phages Binding Autoantibodies from Sera of AITP-1 and AITP-2 Patients

AITP-1			AITP-2		
Expt 1		Expt 2	Expt 1		Expt 2
After round 3	After round 5	After round 3	After round 3	After round 5	After round 3
c.1 SSSLTSA	c.51 LTRPPWG	c.31 GGHSTPE	c.21 HHKYAPR	c.61 ATSAIHG	c.41 NVPQPPR
c.2 SHYSSYQ	c.52 LTRPPWG	c.32 SSNIWWS	c.22 WAWPWWL	c.64 ATSAIHG	c.42 LAVRPPII
c.3 MSLHPTT	c.53 LTRPPWG	c.33 SHYQHYQ	c.24 SGCRVKH	c.62 LATRPPM	c.43 LARSPGP
c.4 WSRPVVM	c.54 LTRPPWG	c.34 AARLPAI	c.23 KCCDVPL	c.63 FSRNIPP	c.44 MTQYRPA
c.9 WSRPVVM	c.58 MLPSVLP	c.35 FCLPPAA	c.25 EPFGSPL	c.65 FSKVSL	c.45 ATSAIHG
c.5 QYADHHA	c.55 MLPSVLP		c.26 EGKPLPR	c.66 MSAPAFR	
c.6 LPAILPQ	c.56 ATSAIHG		c.27 KVFFPNL	c.67 FTKPLLL	
c.8 FTSALPV	c.57 LAHRLRG		c.28 FVTLPYA	c.68 LSKPPRS	
c.7 FTSSSFP			c.29 WEISTTS		
c.10 WSWPWHW			c.30 LPSRPM		

obtained at Banco Central de Sangre, Centro Medico Nacional S. XXI, Mexico. At the time of blood sampling 10 AITP patients had low platelet counts (between 5 and  $102 \times 10^9/L$ ) and were classified as "active AITP," whereas 5 patients had platelet counts higher than  $137 \times 10^9/L$  and were classified as "AITP in remission." We have used serum samples from 2 active AITP patients (AITP-1 and AITP-2) in biopanning experiments and have evaluated the selected phage clones with all 15 AITP sera in ELISA.

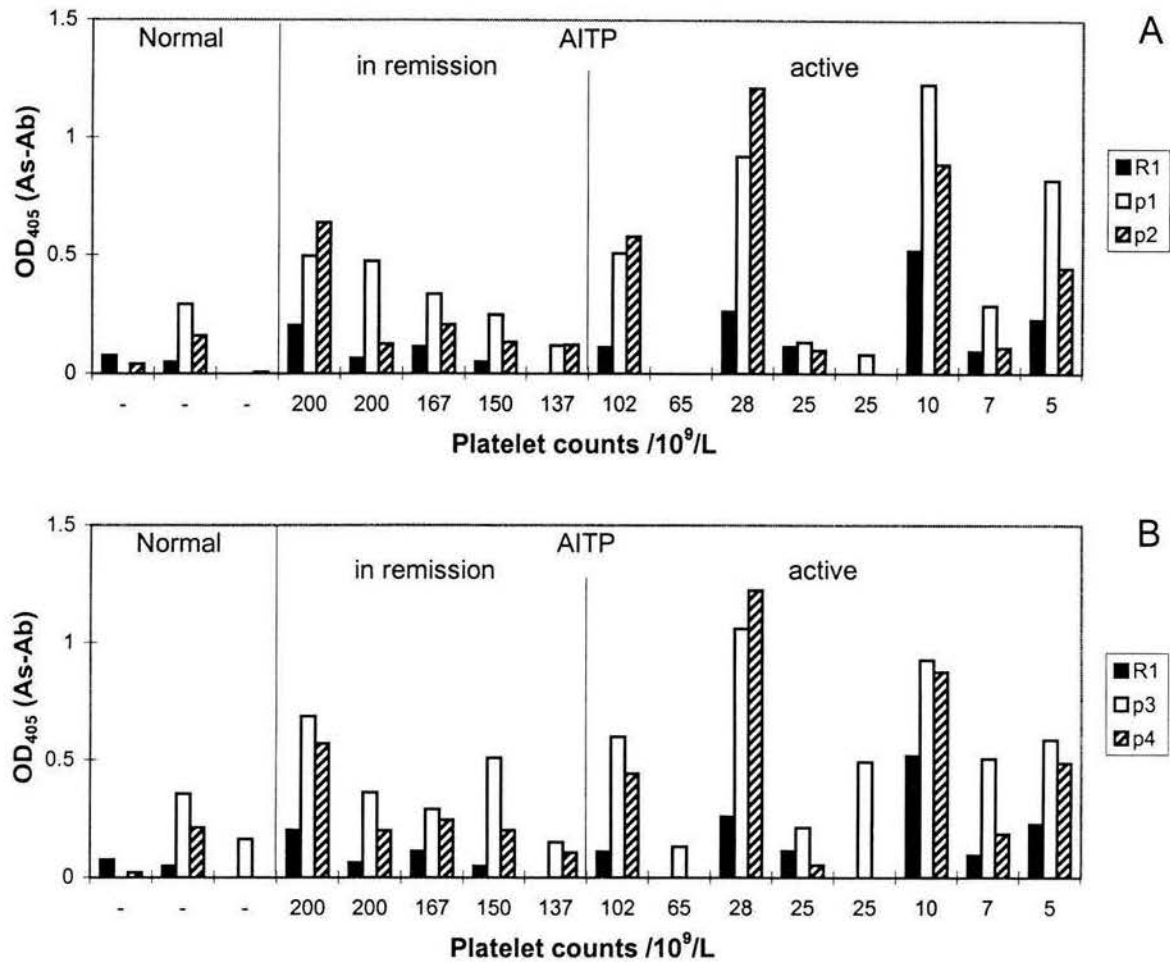
**Phage-display peptide library.** The library of heptapeptides fused to a minor coat protein (pIII) of the filamentous coliphage M13 from New England Biolabs (Beverly, MA) was used.

**Selection of phages by biopanning.** Sera from two AITP patients, AITP-1 (platelet count  $26 \times 10^9/L$ ) and AITP-2 (platelet count  $30 \times 10^9/L$ ), were used for an affinity selection essentially as described by Dower and Cwirla (24). Briefly, 50  $\mu$ l of each serum sample, diluted 1:100, were added to 6 wells of a 96-well ELISA microplate and incubated at 37°C for 1 h. We have performed two separate experiments with both serum samples using two different microplates: Nunc MaxiSorp (Roskilde, Denmark) (Experiment 1), and Dynatech Immulon 1 (U.S.A.) (Experiment 2). After washing with phosphate-buffered saline (PBS), wells were completely filled with PBS/1.0% bovine serum albumin (BSA), and plates were incubated for 1 h at 37°C. Wells were washed with PBS, and  $10^{11}$  transducing units (TU) from the heptapeptide library was allowed to react with immobilized antibodies for 4 h at 4°C. Again, wells were washed with PBS and then bound phage were eluted with 0.1 M HCl/0.1% BSA (pH 2.2 with glycine). Eluates were transferred to microfuge tubes and neutralized with 35  $\mu$ l of 2 M Tris base (pH unadjusted).

The eluted phage were amplified in *Escherichia coli* ER2537 cells and then used for a next round of biopanning. Five rounds were performed in Experiment 1 and three rounds in Experiment 2.

**Determination of peptide sequences.** Single-stranded DNA was prepared from the purified phage as described by Sambrook *et al.* (25) and sequenced with the use of T7 Sequenase version 2.0 Quick-Denature plasmid sequencing kit and [ $\alpha$ - $^{35}$ S]dATP (Amersham Life Science, Cleveland, OH) according to the manufacturer's instructions.

**Enzyme-linked immunosorbent assay.** ELISAs were carried out essentially as previously described (17). Ninety-six-well microtiter plates (Nunc MaxiSorp) were coated overnight at 4°C with phage ( $10^{10}$  TU) in PBS. The plates were blocked for 1 h at 37°C with PBS/5% nonfat milk and then washed with PBS. Serum samples were diluted 1:100 in PBS/1% BSA and then 100  $\mu$ l was added to each well. Plates were incubated for 1 h at 37°C and washed with PBS. Anti-human IgG alkaline phosphatase conjugate diluted 1:2000 in PBS was added, and plates were incubated for 1 h at 37°C. After washing with PBS, substrate (*p*-nitrophenyl phosphate) was added to develop a color reaction. The absorbance (405 nm) was measured after a 30-min incubation at 37°C.  $A_s - A_b$ , where  $A_s$  and  $A_b$  are the absorbance of the sera binding to phage-coated and -uncoated plates, respectively, was calculated for each serum sample. In addition, the reactivity of the serum with the unrelated phage (affinity selected in our previous work using rabbit anti-HIV-1 gp41 peptide serum) should be lower than that with the phage selected in this work.



**FIG. 1.** ELISA reactivity of sera from AITP patients and healthy blood donors with pools of selected phage clones obtained after the third round of biopanning in Experiment 1 (A) and Experiment 2 (B) with AITP-1 (p1 and p3) and AITP-2 (p2 and p4) serum samples. Black histograms represent serum reactivity with unrelated phage R1. ELISA signal is calculated as the average of two duplicates. Results are expressed as the difference between the average  $A_{405nm}$  values for phage-coated (As) and -uncoated (Ab) plates.

## RESULTS AND DISCUSSION

To investigate the structural characteristics of peptides capable of binding to autoantibodies present in sera from AITP patients and responsible for platelet destruction, we screened a heptapeptide phage-display library with serum samples from two active AITP patients, AITP-1 and AITP-2. It is known that sera from AITP patients may contain a complex mixture of autoantibodies with a wide range of specificities for a number of platelet autoantigens, and we expected to identify a panel of candidate disease-related peptides.

Since it had been reported earlier that during routine screening of phage-peptide libraries, clones that bound directly to plastic could be isolated (26), we decided to perform two independent sets of experiments with the same serum sample. We used two different types of microtiter plates, Nunc in Experiment 1 and Immulon in Experiment 2.

Following three rounds of biopanning in Experiment 1 and Experiment 2, the peptide sequences of 30 randomly selected clones were determined (Table 1). In Experiment 1, with the serum sample from AITP-1, only 2 of 10 clones showed similar sequence, WSRPVVM. In the same experiment, but with the AITP-2 serum sample, all 10 clones had different sequences. No obvious linear homology between peptides obtained with the two different serum samples was observed. Similarly, after the third round of biopanning with both sera, AITP-1 and AITP-2, in Experiment 2, all 10 sequenced phage clones had different sequences (Table 1).

A visible enrichment of the peptide library was obtained after two additional rounds of biopanning in Experiment 1. When serum AITP-1 was used, 50% of the phages (4/8) had the same sequence, TRPPWG, and 2 of 8 had the sequence MLPSVLP, while ATSIIIG was present in three phage clones obtained after biopan-

ning with both AITP-1 and AITP-2. Interestingly, the peptide ATSAIHG was obtained in two different sets of experiments of biopanning with two different serum samples (see Table 1), pointing to a high probability of its significance among other phage clones.

To determine whether other AITP patients had autoantibodies that recognized epitopes similar to those recognized by sera from AITP-1 and/or AITP-2, the pools of selected phage clones obtained after the third round in both experiments were tested in ELISA for their reactivity with sera from 15 AITP patients. Also, control sera from healthy blood donors were tested in this assay (Fig. 1). We used as control phage the phagotope R1, selected in our previous work by biopanning with rabbit anti-HIV-1 gp41 peptide serum. Results indicated that at least half of tested patients had autoantibodies reacting with a panel of selected phage clones. Some correlation between platelet count and ELISA reactivity was found. Thus, two sera with highest reactivity had low platelet counts,  $10 \times 10^9$  and  $28 \times 10^9$ /L, respectively. In contrast, 4 patients with platelet counts higher than  $137 \times 10^9$ /L showed low ELISA reactivity. In addition, some of the selected clones were tested separately in ELISA and similar results were obtained (data not shown). Only one phage with sequence HHKYAPR showed low ELISA reactivity with all tested AITP sera.

None of the peptides identified in this study has been described previously as a possible epitope for platelet autoantibodies. However, significant homology between the peptides presented in Table 1 and some platelet glycoproteins, such as GPIb and GPIIIa, was found. Thus, the sequence SLHPT (from phage c.3) is present in platelet GPIb, the sequence PFGSP (phage c.25) has high homology with GPIIIa-derived sequence PLGSP, and the sequence GHSTP (phage c.31) is homologous to AHTTP from GPIb. Each sequence may represent a linear epitope or part of a larger antigenic determinant.

It is known that using the peptide library makes it possible to identify discontinuous epitopes composed of residues distant in the sequence that are brought together by the folding of the polypeptide chain (22). Also, it has been suggested that a majority of antibodies recognize and bind discontinuous epitopes (27). So, some of the peptide epitopes obtained in this study could represent discontinuous epitopes related to AITP. Alternatively, since it is possible to find alternative sequences bearing little resemblance to the initial sequence (mimotopes) in biopanning experiments using phage-displayed peptide libraries (28–30), we can speculate that some of the epitopes obtained may be mimotopes of natural autoantigens. Finally, peptides described in this study could be present in other still-unknown proteins involved in AITP pathogenesis.

In conclusion, we have used the combination of polyclonal autoimmune sera with the random peptide phage-displayed library to identify the repertoire of epitopes recognized by autoantibodies from AITP patients. Although additional studies will be required to determine the significance of the peptides obtained, our results may aid in understanding the mechanism(s) of platelet destruction and defining sequences that mimic natural epitopes, as well as in developing possible diagnostic and therapeutic agents for AITP.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. C. Martinez Murillo and Dr. S. Quintana from Banco Central de Sangre, Centro Medico Nacional S. XXI in Mexico City, for providing the sera from blood donors and AITP patients. We also thank Natalia Nkumah for technical assistance. This work was financially supported by grants from Direccion General de Asuntos del Personal Academico (DGAPA-UNAM, IN213194) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACyT, 5075-M9406).

#### REFERENCES

1. Woods, V. L., Oh, E. H., Mason, D., and McMillan, R., Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic ITP. *Blood* **63**, 368–375, 1984.
2. McMillan, R., Tani, P., Millard, F., Berchtold, L., Renshaw, L., and Woods, V. L., Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood* **70**, 1040–1045, 1987.
3. Tsubakio, T., Tani, P., Woods, V. L., and McMillan, R., Autoantibodies against platelet GPIIb/IIIa in chronic ITP react with different epitopes. *Br. J. Haematol.* **67**, 345–348, 1987.
4. Fujisawa, K., O'Toole, T. E., Tani, P., Loftus, J. C., Plow, E. F., Ginsberg, M. H., and McMillan, R., Autoantibodies to the presumptive cytoplasmic domain of platelet glycoprotein IIIa in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* **77**, 2207–2213, 1991.
5. Fujisawa, K., Tani, P., O'Toole, T. E., Ginsberg, M. H., and McMillan, R., Different species of platelet-associated and plasma autoantibodies to platelet GPIIb-IIIa in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* **79**, 1441–1446, 1992.
6. Kiefel, V., Santoso, S., Kaufmann, E., and Mueller-Eckhardt, C., Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib/IX: A frequent finding in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* **79**, 256–262, 1991.
7. Ruyi, H., Reid, D. M., Jones, C. E., and Shulman, N. R., Spectrum of IgG classes, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* **83**, 1024–1032, 1994.
8. Bowditch, R. D., Tani, P., and McMillan, R., Reactivity of autoantibodies from chronic ITP patients with recombinant glycoprotein IIIa peptides. *Br. J. Haematol.* **91**, 178–184, 1995.
9. Sugiyama, T., Okuma, M., Ushibuki, F., Sensaki, S., Kanaji, K., and Uchino, H., A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood* **69**, 1712–1720, 1987.
10. Pfueller, S. L., David, R., Firkin, B. G., Bilston, R. A., Cortizo, W. F., and Raines, G., Platelet aggregating IgG antibody to platelet surface glycoproteins associated with thrombosis and thrombocytopenia. *Br. J. Haematol.* **74**, 336–341, 1990.

11. Tomiyama, Y., Kekomaki, R., McFarland, J., and Kunicki, T. J., Antivinculin antibodies in sera of patients with immune thrombocytopenia and normal subjects. *Blood* **79**, 161–168, 1992.
12. Hou, M., Stockelberg, D., Kutti, J., and Wadenvik, H., Antibodies against platelet GPIb/IX, GPIIb/IIIa, and other platelet antigens in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur. J. Haematol.* **55**, 307–314, 1995.
13. Bierling, P., Bettaieb, A., Fromont, P., Favrin, M., and Duedari, N., Anti-GMP140 (CD62) autoantibody in a patient with autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* **87**, 631–633, 1994.
14. Scott, J. K., and Smith, G. P., Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249**, 386–390, 1990.
15. Cwirla, S. E., Peters, E. A., Barrett, R. W., and Dower, W. J., Peptides on phage: A vast library of peptides for identifying ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6378–6382, 1990.
16. Felici, F., Castagnoli, L., Musacchio, A., Jappelli, R., and Cesarini, G., Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J. Mol. Biol.* **222**, 301–310, 1991.
17. Dybwad, A., Forre, O., Kjeldsen-Kragh, J., Natvig, J., and Sioud, M., Identification of new B cell epitopes in the sera of rheumatoid arthritis patients using a random nanopeptide phage library. *Eur. J. Immunol.* **23**, 3189–3191, 1993.
18. Dybwad, A., Forre, O., Natvig, J., and Sioud, M., Structural characterization of peptides that bind synovial fluid antibodies from RA patients: A novel strategy for identification of disease-related epitopes using a random peptide library. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **75**, 25–50, 1995.
19. Felici, F., Galfre, G., Luzzago, A., Monaci, P., Nicosia, A., and Cortese, R., Phage-displayed peptides as tools for characterization of human sera. *Methods Enzymol.* **267**, 116–129, 1996.
20. Zhang, H., Zhong, Z., and Pirofski, L.-A., Peptide epitopes recognized by a human anti-cryptococcal glucuronoxylomannan antibody. *Infect. Immun.* **65**, 1158–1164, 1997.
21. Balass, M., Heldman, Y., Cabilly, S., Givol, D., Katchalski Kitzir, E., and Fuchs, S., Identification of a hexapeptide that mimics a conformation-dependent binding site of acetylcholine receptor by use of a phage-epitope library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10638–10642, 1993.
22. Luzzago, A., Felici, F., Tramontano, A., Pessi, A., and Cortese, R., Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides. I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. *Gene* **128**, 51–57, 1993.
23. Felici, F., Luzzago, A., Folgori, A., and Cortese, R., Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides. II. Selection of clones recognized by a protective monoclonal antibody against the Bordetella pertussis toxin from phage peptide libraries. *Gene* **128**, 21–27, 1993.
24. Dower, W. J., and Cwirla, S. E., Epitope mapping using libraries of random peptides displayed on phage. In "Peptide Antigens: A Practical Approach" (G. B. Wisdom, Ed.), pp. 219–243, Oxford Univ. Press, New York, 1994.
25. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Small-scale preparation of single-stranded bacteriophage M13 DNA. In "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, Eds.), pp. 4.29–4.30, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.
26. Adey, N. B., Mataragnon, A. H., Rider, J. E., Carter, J. M., and Kay, B. K., Characterization of phage that bind plastic from phage-displayed random peptide libraries. *Gene* **156**, 27–31, 1995.
27. Davies, R. D., Padlan, E. A., and Sheriff, S., Antibody–antigen complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 439–473, 1990.
28. Lenstra, J. A., Erkens, J. H. F., Langeveld, J. G. A., Posthumus, W. P. A., Meloen, R. H., Gebauer, F., Correa, I., Enjuanes, L., and Stanley, K. K., Isolation of sequences from a random-sequence expression library that mimic viral epitopes. *J. Immunol. Methods* **152**, 149–157, 1992.
29. Hoess, R., Brinkmann, U., Handel, T., and Pastan, I., Identification of a peptide which binds to the carbohydrate-specific monoclonal antibody B3. *Gene* **128**, 43–49, 1993.
30. McConnell, S. J., Kendall, M. L., Reilly, T. M., and Hoess, R. H., Constrained peptide libraries as a tool for binding mimotopes. *Gene* **151**, 115–118, 1994.

Received November 13, 1997; accepted December 1, 1997

## RESULTADOS COLATERALES

---

Los anticuerpos policlonales, producidos en los conejos, en contra de las membranas de plaquetas de ratón, produjeron trombocitopenia y hemorragia a los ratones que se les administró. Con el objetivo de identificar cuales eran los epitopes para estos anticuerpos se usó la misma tecnología que en el artículo anterior. En esta ocasión se prefirió una biblioteca de péptidos de una longitud mayor, con 12 aminoácidos, expresados en el mismo fago M13. Además se buscó si dos anticuerpos monoclonales comerciales reaccionaban con los mismos epitopes. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la integrina beta 3 y el complejo completo  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . En este artículo se presentan los resultados obtenidos, así como, la identificación de las proteínas que portan estos determinantes antigénicos.

3. GevorkianG, Maoutcharian K, Govezensky T, Cano JA, **Dominguez V**, Santamaria H, Larralde C. Identification of Mimotopes of of Platelet Autoantigens Associated with Autoimmune Thrombocytopenic Purpura. *J Autoimmunity* 2000;15: 3-40.



# Identification of Mimotopes of Platelet Autoantigens Associated with Autoimmune Thrombocytopenic Purpura

G. Gevorkian\*, K. Manoutcharian\*, T. Govezensky, J. A. Cano, V. Dominguez, H. Santamaria and C. Larralde

*Instituto de Investigaciones Biomedicas,  
Universidad Nacional Autonoma de  
Mexico, Mexico, D.F., Mexico*

Received 10 March 2000  
Accepted 29 May 2000

**Key words:** Autoantibodies, autoantigens, autoimmune thrombocytopenic purpura, phage display peptide library

GPIIb/IIIa, the human platelet glycoprotein complex, is the autoantigen most commonly recognized by autoantibodies in autoimmune thrombocytopenic purpura (AITP). Two murine monoclonal antibodies (mAbs), namely Y2/51 and 5B12, directed against gpIIIa and gpIIb/IIIa, respectively, and rabbit anti-human platelet polyclonal antibodies have been used to select AITP-related epitopes from a phage display peptide library expressing random dodecapeptides in the pIII coat protein of M13 phage. The selected phage clones were tested by ELISA for binding to rabbit anti-human platelet antibodies as well as to sera from AITP patients. Seven clones reacted strongly with rabbit anti-human platelet antibodies, and four clones reacted with sera from AITP patients. Some homology between peptide inserts sequences of selected clones and human platelet gpIIIa and gpIb were found.

© 2000 Academic Press

## Introduction

Autoimmune thrombocytopenic purpura (AITP) is a common hematologic disorder caused by autoantibodies against platelet proteins, and is found in both children and adults. A wide variety of specific antiplatelet autoantibodies exist in patients with AITP. Among them, antibodies against fibrinogen receptor gpIIb/IIIa and von Willebrand factor receptor gpIb/IX are encountered most frequently [1–3]. Also, other autoantigens, e.g. gplα/IIa, vimentin, desmin and CD62, have been reported to be related with AITP [3–6]. However, relevant autoantigens can not be identified in a number of cases, indicating that the repertoire of autoantigenic epitopes on platelets is complex and requires more detailed research.

A number of previous studies have addressed precise localization of autoantigenic epitopes on platelet antigens using enzyme-cleaved fragments and synthetic peptides corresponding to different regions of known platelet proteins. This approach appeared to be useful for identification of continuous epitopes on proteins, but can not be applied for identification of conformational epitopes. Furthermore, it has been shown that cation chelation of gpIIb/IIIa prevents the binding of most of the platelet-associated anti-gpIIb/

IIIa autoantibodies, suggesting that they react with nonlinear epitopes [7]. Other conformational epitopes on platelet antigens that may exist can not be identified by the synthetic peptides or protein fragments approach. Another problem to be resolved is the identification of epitopes of still unknown platelet autoantigens related to AITP.

To further evaluate epitopes of gpIIIa and gpIIb/IIIa complex, as well as to search for epitopes of other platelet autoantigens, we have used in this study a phage display peptide library of dodecapeptides, two monoclonal anti-gpIIIa and anti-gpIIb/IIIa antibodies and rabbit anti-human platelet antibodies. Phage display peptide libraries, first described by Scott and Smith [8], have been used widely in molecular studies of antigen-antibody binding [9, 10] and it has been shown that by the screening of phage libraries with monoclonal and polyclonal antibodies, linear epitopes as well as mimotopes that mimic linear, discontinuous and even non-peptide epitopes of antigen could be identified. Thus, it has been shown that mimotopes selected with anti-HIV-1 gp120 and anti-hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) antibodies induced a specific humoral immune response to gp120 and HBsAg, respectively [11, 12]. Application of phage display technology has led to the identification of peptide mimotopes of carbohydrates [13–15] providing a new strategy for selection of immunogens for the development of anti-polysaccharide vaccines. Recently, two hexapeptide sequences that mimic autoantibody epitopes located within the cytoplasmic region of platelet gpIIIa and one hexapeptide sequence that mimics an epitope in the extracellular

\*G.G. and K.M. contributed equally to this study and are listed as co-first authors.

Correspondence to: Dr Goar Gevorkian, Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, Mexico D.F., Mexico. Fax: (525)6223369. E-mail: gokar@servidor.unam.mx

portion of gpIIb/IIIa were identified using phage display library approach [16]. Also, we reported earlier some new possible epitopes for anti-platelet autoantibodies identified by using AITP patients' sera and phage display heptapeptide library [17].

In the present study we identified other phage-displayed dodecapeptides that react in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with AITP patients' sera. A homology between identified epitopes and platelet gpIIIa was found. Our results could be of interest in the development of diagnostic and therapeutic agents for AITP as well as for understanding the mechanisms of platelet destruction.

## Materials and Methods

Mouse IgG1 mAbs, specific for human platelet gpIIIa (clone Y2/51) and gpIIb/IIIa (clone 5B12) were purchased from Dako (Glostrup, Denmark). Rabbit anti-human platelet serum was produced by immunization of animals with lysed platelets prepared as described [18].

### Human sera

Sera from 20 AITP patients and clinically healthy blood donors were obtained at Banco Central de Sangre, Centro Medico Nacional S.XXI, Mexico. All patients had antibodies against at least one of the platelet major antigen (gpIIb/IIIa, gpIa/IIa, gpIb/IX or gpIV) detected using a commercial assay.

### Affinity selection of phages by biopanning

Selection of phages by biopanning was performed as described in our previous works [17, 19]. Phage Display Peptide Library from New England Biolabs (Beverly, MA, USA) was used. The displayed 12-mer peptides are expressed at the N-terminus of a minor coat protein (pIII) of M13 phage. The complexity of library is about  $1.9 \times 10^9$  transformants. In biopanning experiments with mouse mAbs Nunc MaxiSorp (Roskilde, Denmark) microplates were used. In experiments with rabbit anti-human platelet Abs microplates coated with sheep anti-rabbit IgG (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) were used. Rabbit serum and mAbs were diluted in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% bovine serum albumin (BSA). Plaque-forming units (PFU) ( $10^{11}$ ) from the original library were used in the first round and the same amount of amplified eluate ( $10^{12}$ ) was used in all subsequent rounds.

### DNA sequencing

Single-stranded DNA was prepared from the purified phage as described by Sambrook *et al.* [20]. T7 Sequenase version 2.0 Quick-Denature plasmid sequencing

kit (Amersham, UK) and [ $\alpha$ - $^{35}$ S] dATP (Amersham) were used according to the manufacturer's instructions.

### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Two types of ELISA were performed. In the first set of experiments carried out as described in our previous work [17, 19],  $10^{10}$  PFU of corresponding phage clones diluted in 100  $\mu$ l PBS (pH 7.4) were added to each well of Nunc MaxiSorp microplates and incubated overnight at 4°C. Rabbit sera were diluted 1:200 and human sera were diluted 1:100 in PBS/1%BSA. Goat anti-human IgG and sheep anti-rabbit IgG antibodies conjugated with Horseradish Peroxidase and ABTS Single Solution (all from Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) were used. All samples were tested in duplicate. The absorbance was measured at 405 nm after incubated at 37°C. In the second set of experiments Nunc MaxiSorp microplates were coated first with anti-M13 monoclonal antibody (Amersham) diluted in PBS, and after blocking plates with PBS/3%BSA phage clones ( $10^{11}$ /ml) were added. After 2 h incubation at 37°C, plates were washed with PBS-Tween 20, rabbit and human sera were added and the subsequent steps were performed as described above.

### Statistical analysis

Statistical significance was determined using the odds ratio test. A *P*-value <0.1 was considered statistically significant.

### Homology search

Regions of amino acid similarity between peptide inserts of the selected clones and sequences in SWISS-PROT protein sequence database were identified using WU-BLAST 2 computer program ('default' parameters were used).

## Results

### Screening of phage peptide library with mAbs

The library of dodecapeptides displayed randomly as a fusion to the minor coat protein of phage M13 was screened in two experiments with anti-human platelet gpIIIa (clone Y2/51) and gpIIb/IIIa (clone 5B12) mAbs. Four rounds of biopanning were performed in each experiment. After the first round of biopanning  $10^3$  and  $10^4$  phages of the initial  $10^{11}$  phages were eluted from plates coated with Y2/51 and 5B12 mAbs, respectively (Table 1). The amount of input phage in all subsequent rounds was  $10^{12}$ . As shown in Table 1, in biopanning experiment with Y2/51 mAb, the

**Table 1.** Affinity selection of phages that bind to Y2/51 and 5B12 mAbs and rabbit anti-human platelet polyclonal antibody

Ab	1st Round		2nd Round		3rd Round		4th Round	
	In <sup>a</sup>	Out <sup>b</sup>	In	Out	In	Out	In	Out
Y2/51	10 <sup>11</sup>	5×10 <sup>3</sup>	10 <sup>12</sup>	3×10 <sup>5</sup>	10 <sup>12</sup>	1.3×10 <sup>8</sup>	10 <sup>12</sup>	2×10 <sup>8</sup>
5B12	10 <sup>11</sup>	1.2×10 <sup>4</sup>	10 <sup>12</sup>	2.8×10 <sup>5</sup>	10 <sup>12</sup>	3×10 <sup>7</sup>	10 <sup>12</sup>	5×10 <sup>7</sup>
Rabbit	10 <sup>11</sup>	2×10 <sup>3</sup>	10 <sup>12</sup>	2×10 <sup>5</sup>	10 <sup>12</sup>	3×10 <sup>7</sup>	10 <sup>12</sup>	2×10 <sup>9</sup>

<sup>a</sup>The total number of phage added to Ab-coated plate.

<sup>b</sup>The total number of specific phage eluted from Ab-coated plates after each round.

**Table 2.** Deduced amino acid sequences of the insert in phage clones isolated after fourth round of biopanning with Y2/51 and 5B12 mAbs

Clones <sup>a</sup>	Sequence												Frequency <sup>b</sup>
J1, J4, J12, J13	A	A	H	M	Q	R	F	P	L	L	H	Q	4/16
J2	L	A	T	T	K	P	S	H	L	T	R	L	1/16
J3, J5, J6	F	S	K	P	S	A	A	L	T	H	D	T	3/16
J7	S	I	H	H	W	P	M	L	F	R	L	P	1/16
J8	L	S	P	F	P	K	Y	P	P	K	I	P	1/16
J9, J10, J15	M	S	P	M	H	K	Q	S	R	A	T	Y	3/16
J11, J16	S	F	L	T	P	W	F	T	H	F	P	R	2/16
J14	V	S	H	L	P	T	L	K	M	P	S	A	1/16
J41	M	T	F	S	T	K	G	S	T	T	S	G	1/16
J42	S	T	M	H	H	H	L	A	P	F	I	A	1/16
J43	Y	V	H	S	T	Q	P	L	T	P	Q	N	1/16
J44, J50	H	T	Y	S	W	P	T	L	H	P	N	G	2/16
J46	T	P	V	M	P	P	R	W	A	V	A	L	1/16
J47	S	S	H	V	Q	S	W	R	L	P	K	A	1/16
J48	Q	G	L	P	F	H	A	A	L	R	L	L	1/16
J49	I	R	P	W	I	W	T	P	D	I	R	S	1/16
J51	Y	N	T	T	T	P	V	P	Q	D	L	S	1/16
J52	I	P	L	H	W	H	A	D	Q	T	R	W	1/16
J53	L	P	S	S	I	R	L	H	S	H	F	P	1/16
J54	F	P	F	Q	H	M	S	L	K	H	I	D	1/16
J55	F	S	T	S	P	S	Y	S	P	V	W	R	1/16
J56	S	W	H	V	W	P	Y	H	Q	D	R	S	1/16
J57	T	P	V	S	N	D	D	L	A	Q	K	R	1/16

<sup>a</sup>Phage clones J1-J16 were selected with Y2/51 mAb and clones J41-J57 with 5B12 mAb.

<sup>b</sup>Number of times each sequence was independently isolated.

amount of affinity selected phage increased by approximately 100-fold after the second round, by approximately 1000-fold after the third round and remained the same after the fourth round. In biopanning experiment with 5B12 mAb, the amount of affinity selected phage increased approximately 10-fold after the second round, approximately 100-fold after the third round and maintained the same value after the fourth round.

The 16 plaques were randomly selected from the plated eluate after the fourth round of each experiment. DNA sequences of dodecapeptide inserts of 32 phage clones were determined and the deduced amino acid sequences are shown in Table 2. Only two of 16 phage clones selected with 5B12 mAb have identical peptide inserts. In contrast, peptide inserts of four phage clones selected with Y2/51 mAb had the same sequence AAHMQRFPLLHQ, three have a

sequence FSKPSAALTHDT, another group of three phage clones has a sequence MSPMHKQSRATY and two clones have a sequence SFLTPWFTHFPR.

Frequency analysis of the relative occurrence of the 20 amino acids in the dodecapeptides displayed by 66 randomly selected phage clones from original library and 32 phage clones picked after the fourth round of biopanning revealed that histidine ( $P<0.05$ ) was frequent in the phages selected in both biopanning experiments and lysine ( $P<0.1$ ), methionine ( $P<0.1$ ) and phenylalanine ( $P<0.05$ ) were most frequent in phage clones selected with 5B12 mAb (Table 3). In contrast, in both experiments there was a selection against glutamic acid ( $P<0.05$ ).

Sequence comparison between the inserts of the selected clones and human gpIIb/IIIa showed some homologies. Thus, the XSPZ motif where X=L,Y or M and Z=F,V or M present in five clones was found



**Table 3.** Frequency of occurrence of 20 amino acids in the dodecapeptides displayed by 66 randomly selected phage clones from original library and 32 phage clones picked after fourth round of biopanning experiments with Y2/51 and 5B12 mAbs

Amino acid	Frequency (%)		
	Original library	Y2/51	5B12
Alanine (A)	5.4	9.90	5.21
Arginine (R)	4.4	5.73	5.21
Asparagine (N)	4.3	0.00	2.60
Aspartic acid (D)	3.5	1.56	3.65
Cysteine (C)	0.4	0.00	0.00
Glutamine (Q)	5.6	5.73	4.69
Glutamic acid (E)	2.8	0.00	0.00
Glycine (G)	3.3	0.00	2.60
Histidine (H)	5.1	10.42	9.38
Isoleucine (I)	3.5	1.04	3.65
Leucine (L)	10.9	10.94	8.33
Lysine (K)	2.7	5.21	2.08
Methionine (M)	3.4	6.25	2.08
Phenylalanine (F)	2.9	7.81	3.65
Proline (P)	11.9	12.50	11.98
Serine (S)	10.9	9.90	11.98
Threonine (T)	10.1	8.85	9.90
Tryptophan (W)	1.9	1.56	5.73
Tyrosine (Y)	2.8	2.08	3.13
Valine (V)	4.4	0.52	4.17

A	
gpIIIa (aa19–23)	<b>A V S P M</b>
J8	<i>L S P F P K Y P P K I P</i>
J9, J10, J15	<i>M S P M H K Q S R A T Y</i>
J55	<b>F S T S P S Y S P V W R</b>
B	
gpIb (aa315–323)	<b>P T K A H T T P W</b>
PL3, PL8, PL12	<b>L A H P T S G H T L P W</b>
C	
CD 144 antigen (aa615–624)	<b>T L L I F L R R R L</b>
PL4	<b>A K T M V I F L R R R L</b>

**Figure 1.** Amino acid sequence homologies among selected clones and human proteins. The peptide sequence is preceded by the phage clone or human protein name. Identical and similar amino acids are given in bold and in italics, respectively. Human protein sequences are from the Swiss-Prot protein sequence database. (A) Homology with platelet gpIIIa. (B) Homology with platelet gpIb. (C) Homology with CD144 antigen.

to be homologous to a region of the extracellular amino-terminal part of gpIIIa (Figure 1A).

#### Screening of phage peptide library with rabbit anti-human platelet lysate polyclonal antibodies

The library of dodecapeptides expressed on phage was also screened with rabbit anti-human platelet

lysate polyclonal antibodies. After the first round of biopanning  $10^3$  phages of the initial  $10^{11}$  phages were eluted from microtiter plates coated first with anti-rabbit IgG polyclonal antibody and then sensitized with rabbit anti-human platelet antibodies. We used these plates to let antibodies to be oriented in such a manner than maximizes the number of antigen-binding sites free to interact with the phage-displayed peptides. As shown in Table 1, in biopanning experiment with rabbit polyclonal antibodies, the amount of affinity selected phage increased by approximately 100-fold after each round of selection. Four rounds of biopanning were performed.

The 16 plaques were randomly selected from the plated eluate after the fourth round of biopanning and DNA sequences of their dodecapeptide inserts were determined. The deduced amino sequences are shown in Table 4. Three clones (PL3, PL8 and PL12) have an identical sequence LAHPTSGHTLPW and two clones have a sequence SGLAKFCLAPLP. It is interesting to note that the motif SGHTLPW from the carboxy-terminal part of repeated clones was encountered also in another clone (PL15) also at carboxy-end: WRILAS-GHTLPW. The SGH motif from four clones also was present in gpIIIa. Another homology of PL3=PL8=PL12 was found and appears to be with human platelet gpIb  $\alpha$  chain precursor (Figure 1B). High homology of clone PL4 with human vascular endothelial-cadherin precursor (CD144 antigen) was found (Figure 1C).

#### ELISA using phage as antigen to detect anti-platelet antibodies

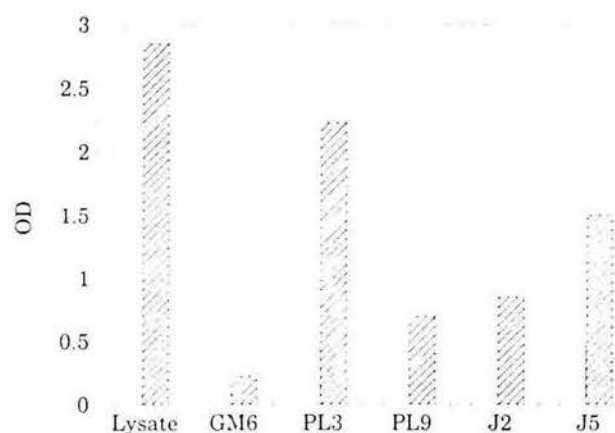
The binding of the affinity selected phage clones to rabbit anti-human platelet antibodies was characterized by ELISA. Two types of ELISA were performed. In the first set of experiments all phage clones were evaluated using plates coated directly with phage. In the second set of experiments plates were previously coated with anti-M13 monoclonal antibody, then phage (only phage clones selected with rabbit anti-human platelet antibody) were added. In this case anti-M13 monoclonal antibody reacted with pVIII protein of phage particle, and peptides expressed as fusion with pIII would be accessible for serum IgG. When plates were coated with phage alone, four clones (PL3, PL9, J2 and J5) were strongly positive (Figure 2). When anti-M13 monoclonal antibody was used to coat plate and then phage were added, three clones (PL3 PL9, and PL15) were strongly positive (Figure 3). No reaction of positive clones with rabbit preimmune serum as well as control rabbit (anti-T1 peptide) serum was observed. Non-related phage GM6 isolated in our previous work did not react with rabbit sera in both experiments indicating to the specificity of reaction of the selected phage by anti-human platelet Abs.

The most strongly binding clones were then chosen and further evaluated in ELISA with human sera to investigate whether sera from AITP patients contain antibodies against the selected epitopes. In the first set

**Table 4.** Deduced amino acid sequences of the inserts in phage clones isolated after fourth round of biopanning with rabbit anti-human platelet serum

Clones	Sequence												Frequency <sup>a</sup>
Pl1	Q	I	W	H	H	Y	P	N	S	Q	L	L	1/16
Pl2	L	E	M	F	P	D	K	N	Q	R	L	T	1/16
Pl3, Pl8, Pl12	L	A	H	P	T	S	G	H	T	L	P	W	3/16
Pl4	A	K	T	M	V	I	F	L	R	R	R	L	1/16
Pl5, Pl10	S	G	L	A	K	F	C	L	A	P	L	P	2/16
Pl6	Y	L	Q	S	N	T	E	P	K	Q	D	S	1/16
Pl7	M	F	P	M	G	M	S	Q	R	P	F	S	1/16
Pl9	D	V	L	M	H	G	F	D	P	A	L	I	1/16
Pl13	N	R	T	P	E	I	L	H	S	I	M	H	1/16
Pl14	T	T	H	H	Y	G	Y	K	S	G	Y		1/16
Pl15	W	R	I	L	A	S	G	H	T	L	P	W	1/16
Pl16	S	V	R	S	P	H	L	F	P	V	M	R	1/16

<sup>a</sup>Number of times each sequence was independently isolated.

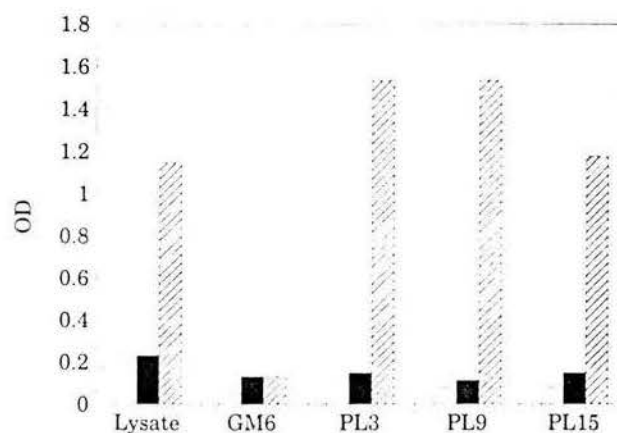


**Figure 2.** Reactivity of rabbit anti-human platelet serum with phage clones in ELISA. Sera were added to plates coated with phage alone and binding was analysed as described in Materials and Methods. Each OD value represents the mean of duplicate determinations. Platelet lysate was used as positive control. Non-related phage GM6 was used as negative control. Preimmune (□), immune (▨).

of experiments with human sera plates were coated with phage alone. Unrelated phage GM6 and PL3 were tested with sera from two AITP patients previously shown to react with platelet lysate (Figure 4). Both sera reacted with PL3, and no reaction with control non-related phage was observed. In the next set of experiments three clones (PL3, PL15 and PL9) were evaluated using sera from twenty AITP patients (Figure 5A & B). Ten sera reacted with both PL8 and PL15 and eight sera reacted with PL9. No reaction was observed with sera from healthy donors.

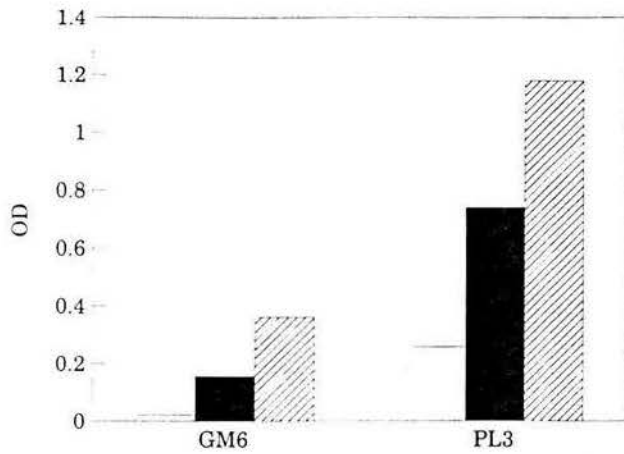
## Discussion

Autoantibodies directed against human platelet gpIIb and gpIIb/IIIa complex have been described earlier as a major target for anti-platelet antibodies present in patients with AITP. Also, other platelet proteins as



**Figure 3.** Reactivity of rabbit sera with phage clones in ELISA. Sera were added to plates coated first with anti-M13 monoclonal antibody, then with phage clones. Binding was analysed as described in Materials and Methods. Each OD value represents the mean of duplicate determinations. Platelet lysate was used as positive control. Non-related phage GM6 was used as negative control. Anti-T1 peptide serum produced previously was used as control serum. Preimmune (□), anti-T1C (unrelated) (■), anti-human platelet (▨).

well as other membrane constituents, e.g. glycolipids have been reported to be associated with AITP [2]. To analyse further the repertoire of autoantigenic epitopes of human platelets we have characterized the binding epitopes of two murine monoclonal antibodies (Y2/51 and 5B12) reacting with human platelet gpIIb and gpIIb/IIIa complex as well as peptides binding to rabbit anti-human platelet antibodies. 5B12 mAb was shown to inhibit *in vitro* proplatelet formation [21]. Two previous studies used AITP patients' sera and phage libraries to identify peptide sequences recognized by anti-platelet autoantibodies [16, 17]. The advantage of a screening library with platelet antigen-specific monoclonal or polyclonal antibodies is that the selection of epitopes recognized by unrelated antibodies present in patient sera could be avoided.

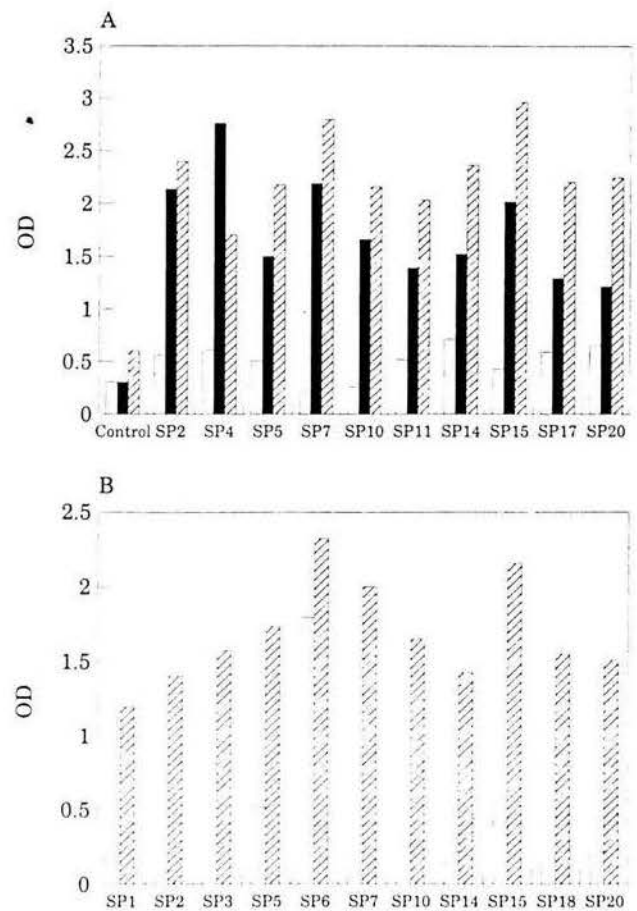


**Figure 4.** Reactivity of AITP patients sera with phage clones in ELISA. Sera were added to plates coated with phage alone and binding was analysed as described in Materials and Methods. Each OD value represents the mean of duplicate determinations. Non-related phage GM6 was used as control. Donor (□), AITP-8 (■), AITP-15 (▨).

The sequence analysis of the phage dodecapeptide inserts showed that the sequences of peptides selected with the Y2/51 mAb were enriched in histidine, methionine and phenylalanine, and peptides selected with the 5B12 mAb were enriched in histidine and tryptophan. This may indicate involvement of these residues in a specific contact with mAbs. The over-representation of aromatic residues (tryptophan, phenylalanine and tyrosine) was reported earlier in the sequences of peptides selected with other mAbs [22, 23] and the authors suggested that this was likely to be due to the abundance of aromatic residues at the bottom of the paratope in mAb since it is known that aromatic residues make stable contact between them.

It is known that an autoepitope is not necessarily a continuous primary sequence but may be a conformation-dependent discontinuous one. Several discontinuous epitopes have already been mapped using phage display peptide libraries [24–26]. We have shown that three identical clones (PL3, PL8 and PL12) selected with rabbit anti-human platelet antibodies had some homology with stretches of amino acid residues within human platelet gpIb (Figure 1). The presence of anti-gpIb antibodies among anti-human platelet antibodies was described earlier [27, 28], but fine epitope mapping has not been performed.

In order to evaluate the ability of the affinity selected phage clones to detect anti-platelet antibodies, ELISA experiments using rabbit anti-human serum as well as sera from patients with AITP were performed. The advantage of specific phage-based assay may consist in availability of phage compared with purified platelet glycoproteins or murine monoclonal antibodies against the antigen of interest used in previous studies [29–31]. As shown in Figures 2–5, phage PL3 with peptide insert sequence homologous with platelet gpIb was strongly positive in ELISA with rabbit anti-human platelet serum and sera from patients with AITP. These data include that above mentioned peptide sequence may represent a mimo-



**Figure 5.** Reactivity of AITP patients sera with phage clones in ELISA. Sera were added to plates coated first with anti-M13 monoclonal antibody, then with phage clones. Binding was analysed as described in Materials and Methods. Each OD value represents the mean of duplicate determinations. Serum from healthy donor with normal platelet count was used as control. (A) Non-related (□), PL3 (■), PL15 (▨). (B) Non-related (□), PL9 (▨).

tope of a discontinuous epitope on platelet gpIb. Also, it is interesting to note, that phage clones PL3 and 15 that shared a common SGHTLPW sequence reacted strongly in ELISA with both rabbit anti-human platelet and AITP patients' sera and no reaction was observed with preimmune and control (anti-T1 peptide) sera as well as sera from control healthy donors (Figures 2–5). These data indicate that peptide SGHTLPW may be also involved in AITP and is an interesting target for further investigation.

While the recognition of the clones sharing sequence homology with known platelet antigens by platelet-specific rabbit and human sera could be the result of such a homology, the positive reaction of some clones without any sequence similarity with platelet autoantigens by the same sera is indicating that these peptides are involved in complex antigen-antibody interaction and may represent mimotopes of platelet autoepitopes. The latter assumption is supported by the fact that the antigenic mimicking is functional, involving similar binding interactions rather than exact similarity of peptide sequences representing antigenic determinants.

In conclusion, our results indicate that phage selection can generate epitope mimics that bind to anti-human platelet antibodies in rabbit and human sera. By determining the spectrum of specificities of the autoantibody repertoire in AITP, we will be able to answer questions regarding the molecular mechanism of pathogenesis of the disease. Also, more specific and reliable reagents for diagnosis and treatment could be developed.

## Acknowledgements

We thank Dr R. Ambriz, M. E. Villalobos and B. Solis for kindly providing sera from AITP patients. We appreciate technical assistance of Juanita Ordoñez, Natalia N. Kopitin, Erik González, Yetzi Robles, Carmen Bautista and Jorge Valencia. This work was supported in part by National Institutes of Health grant 1R21CA82100-01.

## References

1. Woods V.L., Oh E.H., Mason D., McMillan R. 1984. Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic ITP. *Blood* **63**: 368–375
2. Kiefel V., Santoso S., Kaufmann E., Mueller-Eckhardt C. 1991. Autoantibodies against platelet glycoprotein IIb/IX: A frequent finding in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* **79**: 256–262
3. He R., Reid D.M., Jones C., Shulman N.R. 1994. Spectrum of IgG classes, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* **83**: 1024–1032
4. Sugiyama T., Okuma M., Ushibuki F., Sensaki S., Kanaji K., Uchino H. 1987. A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood* **69**: 1712–1720
5. Pfueller S.L., David R., Firkin B.G., Bilston R.A., Cortizo W.F., Raines G. 1990. Platelet aggregating IgG antibody to platelet surface glycoproteins associated with thrombosis and thrombocytopenia. *Br. J. Haematol.* **74**: 336–341
6. Bierling P., Battaieb A., Fromont P., Favrin M., Duedari N. 1994. Anti-GMP140 (CD62) autoantibody in a patient with autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* **87**: 631–633
7. Fujisawa K., McMillan R. 1993. Platelet-associated antibody to glycoprotein IIb/IIIa from chronic immune thrombocytopenic purpura patients often binds to divalent cation-dependent antigens. *Blood* **81**: 1284–1289
8. Scott J.K., Smith G.P. 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249**: 386–390
9. Grihalde N.D., Chen Y.C.J., Golden A., Gubbins E., Mandecki W. 1995. Epitope mapping of anti-HIV and anti-HCV monoclonal antibodies and characterization of epitope mimics using a filamentous phage peptide library. *Gene* **166**: 187–195
10. Germaschewski V., Murray K. 1995. Screening a monoclonal antibody with a fusion-phage display library shows a discontinuity in a linear epitope within preS1 of hepatitis B virus. *J. Med. Virol.* **45**: 300–305
11. Keller P.M., Arnold B.A., Shaw A.R., Tolman R.L., van Middlesworth F., Bondy S., Rusiecki V.K., Koenig S., Zolla-Pazner S., Conard P., Emini E.A., Conley A.J. 1993. Identification of HIV vaccine candidate peptides by screening random phage epitope libraries. *Virology* **193**: 709–716
12. Motti C., Nuzzo M., Meola A., Galfre G., Felici F., Cortese R., Nicosia A., Monaci P. 1994. Recognition by human sera and immunogenicity of HBsAg mimotopes selected from an M13 phage display library. *Gene* **146**: 191–198
13. Westerink M.A., Giardina P.C., Apicella M.A., Kieber-Emmons T. 1995. Peptide mimicry of the meningococcal group C capsular polysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 4021–4025
14. Valadon P., Nussbaum G., Boyd L.F., Margulies D.H., Scharff M.D. 1996. Peptide libraries define the fine specificity of anti-polysaccharide antibodies to *Cryptococcus neoformans*. *J. Mol. Biol.* **261**: 11–22
15. Phalipon A., Folgari A., Arondel J., Sgaramella G., Fortugno P., Cortese R., Sansonetti P.J., Felici F. 1997. Induction of anti-carbohydrate antibodies by phage library-selected peptide mimics. *Eur. J. Immunol.* **27**: 2620–2625
16. Bowditch R.D., Tani P., Fong K.C., McMillan R. 1996. Characterization of autoantigenic epitopes on platelet glycoprotein gpIIb/IIIa using random peptide libraries. *Blood* **88**: 4579–4584
17. Gevorkian G., Manoutcharian K., Almagro J.C., Govezensky T., Dominguez V. 1998. Identification of autoimmune thrombocytopenic purpura-related epitopes using phage-display peptide library. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **86**: 305–309
18. Fujisawa K., Tani P., O'Toole T.E., Ginsberg M.H., McMillan R. 1992. Different specificities of platelet-associated and plasma autoantibodies to platelet gpIIb-IIIa in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* **79**: 1441–1446
19. Manoutcharian K., Sotelo J., Garcia E., Cano A., Gevorkian G. 1999. Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using phage display peptide library. *Clin. Immunol.* **91**: 117–121
20. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Small-scale preparation of single-stranded bacteriophage M13 DNA. In *Molecular cloning: a laboratory manual*. J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 4.29–4.30
21. Takahashi R., Sekine N., Nakatake T. 1999. Influence of monoclonal antiplatelet glycoprotein antibodies on in vitro human megakaryocyte colony formation and proplatelet formation. *Blood* **93**: 1951–1958
22. Young A.C.M., Valadon P., Casadevall A., Scharff M.D., Sacchettini J.C. 1997. The three-dimensional structures of a polysaccharide binding antibody to *Cryptococcus neoformans* and its complex with a peptide from a phage display library: implications for the identification of peptide mimotopes. *J. Mol. Biol.* **274**: 622–634
23. De Bolle X., Laurent T., Tibor A., Godfroid F., Weynants V., Letesson J.J., Mertens P. 1999. Antigenic properties of peptide mimics for epitopes of the

- lipopolysaccharide from *Brucella*. *J. Mol. Biol.* **294**: 181–191
24. Chen Y.-C.J., Delbrook K., Dealwis C., Mimms L., Mushahwar I.K. 1996. Discontinuous epitopes of hepatitis B surface antigen derived from a filamentous phage peptide library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 1997–2001
25. Birkenmeier G., Osman A.A., Kopperschlager G., Mothes T. 1997. Epitope mapping by screening of phage display libraries of a monoclonal antibody directed against the receptor binding domain of human  $\alpha$ 2-macroglobulin. *FEBS Letters* **416**: 193–196
26. Boots L.J., McKenna P.M., Arnold B.A., Keller P.M., Gorny M.K., Zolla-Pazner S., Robinson J.E., Conley A.J. 1997. Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 human monoclonal antibodies that bind discontinuous epitopes in the viral glycoproteins can identify mimotopes from recombinant phage peptide display libraries. *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**: 1549–1559
27. Woods V.L., Kurata Y., Montgomery R.R., Tani P., Mason D., Oh E.H., McMillan R. 1984. Autoantibodies against platelet glycoprotein gpIb in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* **64**: 156–160
28. Hou M., Stockelberg D., Kutti J., Wadenvik H. 1995. Antibodies against platelet GPIb/IX, GPIIb/IIIa, and other platelet antigens in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur. J. Haematol.* **55**: 307–314
29. Hewitt J., Burton I.E. 1994. Incidence of autoantibodies to GPIIb/IIIa in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura may be overestimated by the MAIPA. *Br. J. Haematol.* **86**: 418–420
30. Hurlimann-Forster M., Steiner B., von Felten A. 1997. Quantitation of platelet-specific autoantibodies in platelet eluates of ITP patients measured by a novel ELISA using the purified glycoprotein complexes GPIIb/IIIa and GPIb/IX as antigens. *Br. J. Haematol.* **98**: 328–335
31. Warner M.N., Moore J.C., Warkentin T.E., Santos A.V., Kelton J.G. 1999. A prospective study of protein-specific assays used to investigate idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* **104**: 442–447

## DISCUSION GENERAL

---

La producción de anticuerpos anti-plaqueta se hizo en conejos hembra *New Zealand*, y para comprobar su producción se usó como antígeno un lisado de plaquetas humanas. No fue posible purificar a los anticuerpos específicos contra las plaquetas, porque al adsorberlos a plaquetas y posteriormente despegarlos de las mismas, la preparación contenía muchas proteínas plaquetarias, que podían competir con las plaquetas de los ratones. En lugar de esto se prefirió purificar la fracción de inmunoglobulinas G. Esta preparación por lo tanto contiene inmunoglobulinas G inespecíficas y los anticuerpos IgG anti-plaqueta de interés. Los resultados del artículo central de esta tesis (Domínguez, et al., 2003) demostraron que existe una reacción cruzada *in vitro* entre las IgG anti-plaqueta de ratón y plaquetas humanas. Y que las IgG anti-plaquetas humanas producen trombocitopenia y sangrados moderados en ratones. Situación que se explica por la homología entre los receptores plaquetarios de ambas especies, entre los cuales se encuentran gpIIb-IIIa (integrina  $\alpha_{IIb}\text{-}\beta_3$ ), gpIb-V-IX, CD40, selectina P y selectina E. Lo cual significa que los resultados que se encontraron en el modelo murino de púrpura inmune pueden trasladarse a lo que ocurre en los pacientes con PTA. La homología que existe entre los receptores es de alrededor del 70 % y por lo tanto no se produce el sangrado con la misma severidad que con los anticuerpos homólogos.

Este modelo murino reprodujo el sangrado observado en los pacientes con PTA, es decir sangrado por mucosas y piel. Los signos externos de hemorragia, ocurrieron precisamente en las áreas donde pequeños traumas pueden ocasionar la hemorragia. Por ejemplo en la piel del pabellón de las orejas, en las patas, cola y en la cabeza. Los ratones no se

encontraban aislados en cajas únicas, en una caja había hasta 10 ratones. Unos a otros podían causarse lesiones por contacto, que hizo más evidente el sangrado en los sitios expuestos. Otro ejemplo del sangrado por lesión en el sitio de punción para la administración intraperitoneal de los anticuerpos. Y en el caso de los ratones que se examinaron por una semana, el plexo del ojo donde se realizó la punción para la obtención de la muestra de sangre tenía francas manifestaciones de sangrado. Los ratones presentaron hemorragia intestinal muy evidente ya que las heces salían con sangre fresca. Es decir al realizar el esfuerzo de defecar había ruptura de los vasos sanguíneos del recto lo que condicionó esta hemorragia.

Las manifestaciones hemorrágicas de los órganos internos, muestran sangrados que pudieran llamarse “espontáneos”, ya que el hígado, el intestino grueso, el intestino delgado, el corazón o los pulmones tuvieron las mismas signos hemorrágicos que los órganos externos, como las petequias y equimosis muy grandes, observables a simple vista. Signos que a nivel microscópico se observa por la clara congestión de vasos pequeños, y la presencia de eritrocitos en el espacio intersticial. No se realizó un estudio de microscopía electrónica para apreciar en detalle, la pérdida de la integridad de los vasos sanguíneos.

No se tomó la cuenta de plaquetas antes de dos horas de la administración de los anticuerpos, pero un dato muy importante es que a pesar de que la trombocitopenia ya estaba al nivel más bajo a las dos horas, el sangrado todavía no era evidente. Es decir las plaquetas ya habían sido opsonizadas por los anticuerpos y los macrófagos ya las habían fagocitado, por lo que es posible que los anticuerpos restantes estuvieran fijados a los receptores, compartidos con las plaquetas, de las células endoteliales. Y que estos anticuerpos pudieran ser capaces de activar a estos receptores y permitir la separación de las uniones intercelulares de los vasos sanguíneos, para la salida de los componentes

sanguíneos. En ningún momento pudo observarse la infiltración de células inflamatorias por lo cual puede eliminarse la posibilidad de daño citotóxico a la pared vascular, mediado por complejos inmunes.

Los resultados demuestran que los signos hemorrágicos no concuerdan con las cifras de plaquetas. Los ratones que recibieron la dosis más pequeña, no presentaron ningún dato de sangrado a pesar de tener los mismos niveles en las cuentas plaquetarias. Y sólo los que recibieron dosis medias y altas sangraron. Y a medida que la concentración del anticuerpo se aumentó, ocurrió lo mismo con las manifestaciones hemorrágicas. Es decir, únicamente la trombocitopenia no es lo que hizo sangrar a los ratones. Una posible explicación es que el excedente de anticuerpos se fija a los receptores de las células endoteliales, compartidos con las plaquetas, y que permite la activación del citoesqueleto para retraerse e interrumpir la unión intercelular del endotelio vascular y entonces producirse la extravasación de los componentes celulares sanguíneos. Si esto es cierto, ya no se clasificaría más a la PTA como un enfermedad autoinmune órgano específica.

Es un hecho muy conocido la participación de los receptores de la familia de las selectinas en el deslizamiento de los leucocitos sobre el endotelio vascular y la participación de los receptores de la familia de las integrinas en la fijación y activación tanto del endotelio como de los mismos leucocitos para que ocurra la extravasación. Las plaquetas y las células endoteliales comparten receptores de ambas familias. De la familia de las selectinas comparten las selectina P y E y de la familia de las integrinas comparten los dos receptores de la subfamilia  $\beta_3$ : el clásico receptor de fibrinógeno  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (gpIIb-IIIa) (CD41/CD61) y el clásico receptor de vitronectina  $\alpha_v\beta_3$  (CD51/CD61); y los receptores de la subfamilia  $\beta_1$ : el receptor de colágena  $\alpha_2\beta_1$  (gpIa-IIa) (VLA-2) (CD49b/CD29), el receptor de



fibronectina  $\alpha_5\beta_1$  (gpIc\*-IIa) (VLA-5) (CD49e/CD29) y el receptor de laminina  $\alpha_6\beta_1$  (gpIc-IIa) (VLA-6) (CD49f/CD29). Parece ser que estos mismos receptores participan en el deslizamiento de las plaquetas sobre el endotelio vascular, ya que se ha demostrado que la deficiencia de la selectina P, afecta la movilidad plaquetaria, lo que resulta en tiempos de sangrado alargados, además de afectar la movilidad de los leucocitos (Domínguez, *et al*, 2001 (a) y referencias que allí se citan).

Es muy probable que estos receptores estén siendo activados por los anticuerpos anti-plaqueta, en la misma manera que lo hacen sus ligandos.

Por medio de una reacción de inmunohistoquímica fue posible demostrar que los anticuerpos anti-plaqueta se fijan en forma exclusiva a las células endoteliales. Se requiere de más estudios para demostrar si estos anticuerpos producen señales de activación celular.

En el experimento (Figura 1 del artículo central) en el cual se administró una sola dosis de IgG's anti-plaqueta de ratón se puede observar un pico de trombocitopenia a las 24 horas y el retorno a los niveles basales a los tres días, la administración de IgG's anti-plaquetas humanas, muestra el mismo pico de trombocitopenia y ligera trombocitosis a los tres días, pero la administración de IgG's control muestra una ligera trombocitosis a las 24 horas y un aumento considerable de plaquetas a los tres días. Trombocitosis que se hace todavía más evidente en la figura 2 que corresponde a la administración repetida de IgG's anti-plaquetas de ratón. Es muy interesante el fenómeno del aumento de plaquetas, con la administración de IgG's control, porque precisamente el empleo de inmunoglobulinas G por vía endovenosa (IgGIV) es uno de los tratamientos empleados en los pacientes que cursan con PTA crónica refractaria a los tratamientos convencionales. Se ha postulado que el mecanismo de acción de la IgGIV es a través de disminuir la citocinas IL-6 y M-CSF, que

se encuentran muy elevadas en estos pacientes. En el caso de los ratones, a los cuales se les administró las IgG's control, no hubo recuperación de trombocitopenia, por lo que la IgG inespecífica pudiera estar interfiriendo el proceso normal de destrucción plaquetaria (Domínguez, *et al.*, 2001 y referencias que allí se citan).

Al intentar reproducir la púrpura inmune con los anticuerpos anti-péptidos de la integrina  $\beta_3$ , se observaron los siguientes resultados interesantes.

La producción de anticuerpos anti-PV-2 resultó exitosa, no así la reproducción de púrpura inmune en los ratones. El péptido PV-2 (KKFDREPYMTENTC(A)) tiene algunas diferencias de estructura primaria en la secuencia de la proteína de conejo y de ratón, como se muestra en el siguiente alineamiento:

```

KKFDREPYMTENTC   integrina  $\beta_3$  humana
: : : : :       : : : :
KKFERGVLHEENTC   integrina  $\beta_3$  de conejo
: : : : : : : : : :
KKFNRGTLHEENTC   integrina  $\beta_3$  de ratón
  
```

Los dos puntos significa que los aminoácidos son idénticos, un punto que pertenece al mismo grupo, y sin ninguna anotación, que son completamente diferentes.

Para ver con mayor detalle el alineamiento se hace la siguiente tabla comparativa:

K	K	F	<b>D</b>	R	<b>E</b>	<b>P</b>	<b>Y</b>	<b>M</b>	<b>T</b>	E	N	T	C	Integrina $\beta_3$ humana (aa 644-657)
K	K	E	<b>E</b>	R	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>H</b>	<b>E</b>	E	N	T	C	Integrina $\beta_3$ de conejo (aa 644-657)
K	K	F	<b>N</b>	R	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	<b>H</b>	<b>E</b>	E	N	T	C	Integrina $\beta_3$ de ratón (aa 644-657)

Se resaltan con letras “negritas” los aminoácidos diferentes. Estas diferencias pueden ser importantes en el reconocimiento del anticuerpo, que fue producido con la secuencia de la integrina humana, y entonces, no es posible que se fije a la integrina del ratón.

Por otra parte no fue posible producir anticuerpos anti-PV-3 en conejo. Se comparan las secuencias correspondientes al péptido PV-3 (GCPQEKEKSFTIKP) de las integrinas de humano, de conejo y de ratón en el siguiente alineamiento:

```
GCPQEKEKSFTIKP    integrina β3 humana
: : : : : : : : : :
GCPQEKEKSFTIKP    integrina β3 de conejo
: : : : : : : : : :
GCPQEKEQSFTIKP    integrina β3 de ratón
```

G	C	P	Q	E	K	E	<b>K</b>	S	F	T	I	K	P	Integrina β <sub>3</sub> humana (aa 431-444)
G	C	P	Q	E	K	E	<b>K</b>	S	F	T	I	K	P	Integrina β <sub>3</sub> de conejo (aa 431-444)
G	C	P	Q	E	K	E	<b>Q</b>	S	F	T	I	K	P	Integrina β <sub>3</sub> de ratón (aa 431-444)

La integrina de conejo, tiene la misma estructura primaria que la integrina humana y por esta razón el conejo no pudo producir anticuerpos en contra del péptido PV-3. Se puede observar la diferencia en solo un aminoácido con la integrina de ratón.

Con estos resultados no se puede concluir si los anticuerpos anti péptidos PV-2 y PV-3 están involucrados o no en la fisiopatología del sangrado de la PTA. Lo que si se puede concluir es que no están involucrados en la fisiopatología del sangrado en el modelo murino de púrpura inmune.

Situaciones similares se observaron cuando se administró a los ratones, las dos clonas de anticuerpos monoclonales, de los cuales se obtuvieron los probables epitopes por “phage display” (Gevorkian, *et al.*, 2000). Que ha pesar de que reconocen epitopes localizados en la integrina β<sub>3</sub>, clona Y2/51, y del receptor completo α<sub>11b</sub> β<sub>3</sub>, clona 5B12, son clonas que se obtuvieron en ratón en contra de proteínas humanas y por lo tanto no reaccionan con las proteínas plaquetarias murinas.

En cuanto al estudio de los epitopes involucrados en la PTA, la metodología de péptidos expresados en fagos (“phage display”) permitió observar que el suero de los pacientes con

PTA contienen una mezcla de anticuerpos que reconocen diferentes epitopes que se localizan en proteínas plaquetarias. Por ejemplo la secuencia SLHPT en la proteína Ib y en la integrina  $\beta_3$ . La secuencia PFGSP tiene una alta homología con la secuencia PLGSP de la integrina  $\beta_3$  y la secuencia GHSTP tiene homología con la secuencia AHTTP de la proteína Ib. Interesantemente cada secuencia puede representar un epitopo lineal o ser parte de un determinante antigénico más grande. Incluso pudieran ser parte de epitopes conformacionales (Gevorkian, *et al.*, 1998).

Los epitopes seleccionados por los anticuerpos monoclonales se probaron con el suero de los pacientes con PTA y con el suero hiperinmune de conejo en contra de plaquetas humanas y se presentó una reacción muy importante con varios epitopes, en especial con la secuencia SGHTLPW.

A pesar de que se acepta que la integrina  $\beta_3$  es el principal blanco de los anticuerpos antiplaqueta en la PTA, parece ser que hay otras proteínas contra las cuales se producen anticuerpos. Por lo que identificar todos y cada uno de los epitopes responsables de la destrucción plaquetaria es una tarea muy difícil. En primer lugar por la gran diversidad de probables epitopes de los muchos receptores presentes en la membrana de las plaquetas y en segundo lugar, pero no menos importante, por la gran cantidad de epitopes conformacionales de la estructura tridimensional de las proteínas. Estructura que cambia dependiendo si la plaqueta está en reposo o en estado activado. Además parece ser que no todos los pacientes tienen en su suero el mismo repertorio de autoanticuerpos, es decir, cada paciente cuenta con un repertorio propio. Sería muy interesante poder identificar el epitopo relevante en la producción de los autoanticuerpos de cada paciente para administrar el epitopo correspondiente que compitiera con el antígeno natural impidiendo así su fijación a

la membrana plaquetaria y por lo tanto la opsonización y la consecuente fagocitosis de las plaquetas.

Si fuera posible aceptar que los anticuerpos más bien están dirigidos en contra de proteínas de las células endoteliales, y que la plaqueta por tener receptores comunes a las células endoteliales, captura a estos anticuerpos. Entonces la plaqueta funciona como un vehículo que permite su depuración. Si no fuera de este modo, los anticuerpos producirían mayor daño endotelial, como ocurre en los pacientes con lupus eritematoso sistémico y otras enfermedades autoinmunes, en las cuales la vasculitis es una manifestación muy importante en la patogenia de la enfermedad (Domínguez, *et al.*, 2003 y referencias que allí se citan).

Por lo pronto creo que debe dejar de considerarse a la PTA como una enfermedad autoinmune órgano específica y considerarla como una enfermedad autoinmune sistémica.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## CONCLUSIONES

---

Con los resultados obtenidos en esta tesis se puede concluir lo siguiente:

1. Se produjo un modelo murino de púrpura trombocitopénica inmune que reproduce las manifestaciones hemorrágicas de los pacientes con PTA.
2. Este modelo se puede usar para estudiar el mecanismo terapéutico de la IgGIV.
3. La participación de las células del endotelio vascular es importante en la fisiopatogenia del sangrado.
4. Hay una gran variedad de epitopes que son reconocidos por los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes con PTA.
5. Los epitopes corresponden a varias proteínas de receptores plaquetarios ( $\alpha_{IIb}\beta_3$  gpIB-V-IX, gpIa-IIa)
6. Es probable que muchos de los epitopes sean conformacionales.
7. No fue posible establecer el papel que tienen los anticuerpos anti-PV2 y anti-PV3 de la integrina  $\beta_3$  en la fisiopatogenia de la PTA.
8. Es necesario continuar con el estudio de participación de las células endoteliales en la producción del sangrado.

## PERSPECTIVAS

---

Considero que el trabajo realizado en esta tesis apenas sirve de base para investigaciones futuras. Las líneas de investigación que sería conveniente continuar son:

1. Realizar electroforesis de proteínas de lisado de células endoteliales humanas, transferirlas a nitrocelulosa y realizar técnica de “Western Blot” con el suero hiperinmune anti-plaquetas humanas y el suero de los pacientes con PTA.
2. Identificar cuales son las proteínas que son reconocidas por los sueros de los pacientes con PTA.
3. A las células endoteliales en cultivo, agregar los sueros hiperinmune y de pacientes y medir señales de activación, como la fosforilación en tirosina de las regiones intracitoplasmáticas de las integrinas.
4. Realizar microscopía electrónica de los órganos que presentaron congestión y extravasación de eritrocitos, para estudiar con detalle las uniones intercelulares.

Creo que sería más importante impedir o frenar las manifestaciones hemorrágicas a nivel del endotelio, que corregir la trombocitopenia.

## APÉNDICE MARCO TEÓRICO

---

Para resumir la vasta información relacionada con esta tesis, se presentan los 4 artículos de revisión bibliográfica realizados durante la estancia doctoral. En primer lugar, fue necesario conocer todos los estudios realizados para investigar los mecanismos fisiopatogénicos de la PTA. Los estudios en humanos presentan la desventaja de no contar con un número grande de casos y la dificultad de tener los controles adecuados. Los estudios en modelos murinos son básicamente de dos tipos, los ratones que tienen una enfermedad autoinmune parecida al lupus eritematoso sistémico en humanos, y que, en forma secundaria presentan PTA y los modelos inmunes en los cuales se administran los anticuerpos en contra de antígenos plaquetarios, que no necesariamente son los mismos antígenos presentes en las plaquetas humanas.

Este artículo de revisión comprende los estudios realizados en humanos, tanto *in vitro* como *in vivo*, y los estudios realizados en modelos murinos.

### 1. PURPURA TROMBOCITOPENICA AUTOINMUNE

**Domínguez V** y Rodríguez H. Mecanismos celulares y bioquímicos involucrados en la fisiopatogenia de la púrpura trombocitopénica autoinmune. *Gaceta Médica de México*. 2002; 138: 461-472. Artículo de revisión



## Mecanismos celulares y bioquímicos involucrados en la fisiopatogenia de la púrpura trombocitopénica autoinmune

Ma. Victoria Domínguez-García,<sup>\*\*\*</sup> Héctor Rodríguez-Moyado<sup>\*\*\*</sup>

Recepción versión modificada 05 de abril del 2001; aceptación 17 de abril del 2001

### Resumen

La púrpura trombocitopénica autoinmune (PTA) es un síndrome causado por la destrucción excesiva de plaquetas recubiertas por autoanticuerpos dirigidos contra antígenos de la membrana plaquetaria. Se ha demostrado que la destrucción de plaquetas se lleva a cabo en los macrófagos del sistema retículo endotelial, pero todavía no se conocen los mecanismos inmunológicos involucrados en la destrucción. El objetivo de este artículo es revisar la información acerca de la fisiopatogenia de esta enfermedad.

Ante la dificultad de tener estudios controlados en humanos se ha recurrido a los modelos en animales de laboratorio. Entre estos modelos están los ratones (NZW X BXSB) F1 con púrpura autoinmune, y los llamados ratones "Harrington" con púrpura inmune.

Los estudios en humanos sugieren que existen diferencias en la patogénesis de la PTA aguda y crónica, particularmente al nivel de células T reactivas; por ejemplo, una elevada actividad de Th (CD4+) con actividad reducida T supresora (CD8+) concomitante en la forma crónica, pero en la forma aguda no se ha encontrado predominio de algún fenotipo especial, e incluso puede haber disminución de CD4+. La proliferación de linfocitos inducida por diferentes mitógenos se encuentra elevada en los pacientes con PTA crónica, pero disminuida en los pacientes con PTA aguda.

**Palabras clave:** Púrpura trombocitopénica autoinmune.

### Introducción

A pesar de que se reconoce a la púrpura trombocitopénica autoinmune (PTA) como un síndrome definido, no se cuenta con datos precisos de la incidencia mundial.

### Summary

Autoimmune thrombocytopenic purpura (ATP) is a bleeding disorder caused by excessive destruction of antibody-coated platelets. It is known that platelet destruction takes place in macrophages of reticulo-endotelial system, but immunological mechanisms involved in such destruction are unknown. The objective of this article is to review the literature concerning pathogenesis of ATP: to have controlled experimental conditions some animal laboratory models have been used. The (NZW X BXSB) F1 mice have been studied as autoimmune disease model and Harrington mouse as an immune purpura model.

Studies in humans suggest that there are some differences in pathogenesis of acute or chronic ATP, particularly in reactive T cells. For example, in chronic form there are high levels of The (CD4+) activity concomitant with low levels of T supressor (CD8+) activity, while in acute form there is no dominance of any particular T cell activity or CD4+ is even decreased. Mytogen lymphocyte proliferation is increased in chronic ATP but decreased in acute form.

**Key words:** Autoimmune thrombocytopenic purpura.

Un estudio sueco reportó 6.6 casos por cada 100,000 habitantes y un estudio danés 3.2.<sup>1,2</sup> En México no se cuenta con ningún estudio de su incidencia.

A la fecha no se conoce el mecanismo o los mecanismos involucrados en la producción de autoanticuer-

\* Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, D.F.

\*\* Banco Central de Sangre, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México, D.F.

\*\*\* Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, SS, México, D.F.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Ma. Victoria Domínguez García. Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F. C.P. 04510 Tel.: 56-22-38-54 Fax.: 56-22-33-69 e-mail.: mavi@biomedicas.unam.mx

pos que llevan a la destrucción plaquetaria y a las manifestaciones hemorrágicas. El objetivo de este artículo es revisar la información acerca de la fisiopatogenia de esta enfermedad. En primer lugar desde un punto de vista general, en segundo lugar de lo observado en los modelos en ratón y finalmente de los mecanismos celulares y bioquímicos involucrados.

### *Púrpura trombocitopénica autoinmune*

La PTA es un síndrome causado por la destrucción excesiva de plaquetas recubiertas por autoanticuerpos dirigidos contra antígenos de la membrana plaquetaria. La destrucción de las plaquetas se lleva a cabo en los macrófagos del sistema retículo endotelial.<sup>3-7</sup>

Mediante diversas técnicas de laboratorio se ha podido demostrar la presencia de autoanticuerpos en el suero de hasta el 80% de los pacientes con PTA. La mayoría de los anticuerpos están dirigidos contra epitopos de glucoproteínas de la membrana plaquetaria, principalmente el complejo GPIIb-IIIa, Ib-IX, Ia-IIa, IV y V. En la mayoría de los pacientes se encuentran mezclas de anticuerpos que reaccionan con más de una glucoproteína.<sup>8-16</sup>

La presencia de anticuerpos antiplaqueta en la PTA fue demostrada por vez primera por Harrington *et al.* en el año de 1951.<sup>17</sup>

La clase de inmunoglobulina involucrada es IgG en el 92% de los casos, la subclase IgG1 es la más frecuente (82%).<sup>18-19</sup> Se ha demostrado la fijación de complemento hasta C3b en casos muy raros.<sup>19</sup>

El comportamiento de los anticuerpos antiplaqueta en la fisiopatología de la enfermedad es controversial; sin embargo, en general se está de acuerdo en que el título de éstos disminuye en pacientes que están en remisión y aumenta en periodos de recurrencia de la enfermedad.<sup>16,20</sup>

La PTA puede ser primaria (idiopática) y secundaria. En la PTA primaria no se identifica la causa, la secundaria está relacionada con enfermedades como el lupus eritematoso sistémico (LES), neoplasias, infecciones bacterianas, infecciones virales como en el caso de los virus de la hepatitis B y de la inmunodeficiencia humana (VIH),<sup>21-25</sup> y otras causas fortuitas como el uso de drogas terapéuticas como la quinidina, quinina, heparina, etc.<sup>25</sup>

Entre los adultos, la PTA idiopática afecta principalmente a las mujeres: aproximadamente el 72% de todos los pacientes. En la mayoría de los casos la enfermedad es insidiosa, crónica, recurrente, con episodios de remisión. En los niños en cambio, generalmente se presenta después de una infección viral y afecta a ambos sexos por igual, se inicia abruptamente y remite espontáneamente en el 80% de los casos.<sup>22,25-27</sup>

El diagnóstico de PTA se basa en la historia clínica, el examen físico, la biometría hemática y la observación del extendido de la sangre periférica. El cuadro clínico co-

mún es la presencia de púrpura trombocitopénica. En este síndrome hemorrágico las petequias en piel y mucosas, las epistaxis y gingivorragias son las manifestaciones más comunes. La hematuria, hemorragia de tubo digestivo o del sistema nervioso central son menos frecuentes, pero cuando ocurren ponen en peligro la vida de los pacientes.<sup>27</sup> En la biometría hemática el dato principal es una cuenta de plaquetas baja. Para muchos investigadores clínicos la observación del extendido de sangre periférica es muy importante, ya que proporciona información sobre el tamaño y morfología de plaquetas, eritrocitos y leucocitos, de esta manera se pueden distinguir algunas posibles causas de plaquetopenia.<sup>28</sup>

Para el tratamiento de la PTA, se han empleado históricamente dos recursos: los esteroides suprarrenales como la prednisona, y la esplenectomía. Los primeros son eficaces como tratamiento primario, la segunda como tratamiento electivo en el síndrome agudo y grave y en los casos con recaída en lapso de seis meses.<sup>27-33</sup> La tendencia actual es retardar lo más posible la esplenectomía y el uso de esteroides.<sup>6,34-39</sup>

Un problema importante es el tratamiento de aquellos pacientes con trombocitopenia grave y persistente a pesar de la prednisona y la esplenectomía. Se han intentado numerosas opciones de tratamiento por diferentes grupos de investigadores; como son el uso de esteroides, inmunosupresores (azatioprina), gammaglobulina anti-D endovenosa en dosis altas, gammaglobulina anti-D en dosis bajas en forma de eritrocitos opsonizados; todas ellas con éxito relativo. Los resultados de algunos de estos esquemas de tratamiento no se han logrado reproducir por otros grupos, o bien sólo se observa remisión transitoria.<sup>29-39</sup>

### *Modelo murino*

Desde 1983 se ha usado a los ratones para el estudio de la fisiopatogenia de la púrpura. En los primeros experimentos se demostró la presencia de macrófagos con citoplasma "esponjoso" (células *foamy*). Estas células ya se habían observado en el bazo de los pacientes con PTA. Las células *foamy* fueron inducidas: por inyección subcutánea de plaquetas previamente recubiertas con un anticuerpo anti-plaquetas murinas, inyectando fosfolípidos comercializados (PE, PC, SM, PS) y también con membranas de eritrocitos. Este fenómeno se debe a la degradación incompleta de las membranas plaquetarias en los lisosomas, los fosfolípidos derivados de las membranas de las plaquetas son los responsables del aspecto esponjoso.<sup>40,41</sup>

En 1987 Corash usó un modelo murino de púrpura trombocitopénica inmune, en el cual la trombocitopenia se indujo por inyección intraperitoneal de un anticuerpo antiplaqueta, para evaluar la relación entre la poliploidía

de los megacariocitos y el volumen medio de las plaquetas. No existió correlación ya que la poliploidía aumentó de 16 N a 32 N sólo 48 horas después de la trombocitopenia, y el volumen plaquetario aumentó a las 8 horas.<sup>42</sup>

En 1989 Stenberg en el mismo modelo observó que efectivamente el volumen medio de las plaquetas aumenta a las 8 horas y permanece por 24 horas, 48 horas después, las plaquetas recuperan su volumen normal. Este aumento en volumen se debe a que los megacariocitos liberan plaquetas de mayor tamaño y con características del citoplasma diferentes a las normales. Estos resultados sugieren que las características de las plaquetas liberadas no dependen de la ploidía ni de cambios citoplasmáticos de los megacariocitos. Por lo tanto, tal vez se deba a la acción del anticuerpo sobre el megacariocito.<sup>43</sup>

Los ratones (NZW X BXSB) F1 son un modelo de trombocitopenia autoinmune.<sup>44</sup> La hembra NZW tiene predisposición para LES y el macho BXSB tiene el factor acelerador de autoinmunidad en el cromosoma Y (Yaa).<sup>45</sup> Los ratones machos que resultan de esta cruce desarrollan trombocitopenia a los 4 meses de edad, pero los anticuerpos antiplaqueta se pueden observar desde los 2 meses de edad. Estos ratones desarrollan también nefritis lúpica e infarto del miocardio. Hay una gran correlación entre la presencia de anticuerpos antiplaqueta, la plaquetopenia y el acortamiento de la vida media plaquetaria. Lo que indica que los anticuerpos en la superficie de las plaquetas tienen un papel crucial en la destrucción de las plaquetas, por lo que estos ratones W/B F1 son animales muy útiles como modelo para estudiar la PTA.<sup>46</sup>

El bazo de estos ratones captó una gran cantidad de plaquetas marcadas con radioisótopos en comparación con controles normales. Después de la esplenectomía se observó que las cuentas plaquetarias se elevaban hasta por 6 meses. También la cantidad de anticuerpos unida a la membrana de las plaquetas disminuyó por un tiempo; no así la cantidad de anticuerpos en el suero. A pesar de que el bazo es el principal órgano de producción de anticuerpos y destrucción plaquetaria hay otros órganos donde ocurren estos fenómenos.<sup>47</sup>

Los ratones W/B F1 se trataron con prednisolona y se observó un aumento en la cuenta plaquetaria, 4 semanas después del tratamiento, así como un aumento de la vida media de las plaquetas; pero no se observó reducción en la producción de anticuerpos. Además disminuyó la fagocitosis de eritrocitos autólogos marcados con 51Cr.<sup>48</sup>

Se ha usado deoxispergualina en estos ratones y se observó que previene el desarrollo de trombocitopenia e inhibe la cantidad de anticuerpos circulantes en contra de las plaquetas, también disminuye la nefritis lúpica.<sup>49</sup>

Los ratones W/B F1 que fueron alimentados con una dieta pobre en carbohidratos tuvieron menor cantidad

de anticuerpos anti-plaquetas, menor cantidad de células formadoras de anticuerpos y fagocitosis disminuida de eritrocitos recubiertos de IgG, en comparación con aquellos que recibieron una dieta normal. Estos ratones con dieta normal y posteriormente con dieta restringida hicieron remisión de la trombocitopenia.<sup>50</sup> De estos mismos ratones W/B F1 se aislaron 7 clonas de anticuerpos antiplaquetas que se inyectaron a ratones sin pelo. Dos de estas clonas produjeron trombocitopenia, niveles elevados de anticuerpos unidos a plaquetas, púrpura y megacariocitosis. Dos clonas reaccionaron con DNA de una y de dos cadenas, y una clona reaccionó con cardiolipina, pero ninguna de estas tres últimas fue patogénica. Los anticuerpos monoclonales patogénicos se unieron a una proteína plaquetaria de 100 kD.<sup>50</sup>

Los ratones W/B F1 también tienen hipergammaglobulinemia, básicamente a expensas de IgG2a e IgG2b. La relación de células B pequeñas en reposo y células B grandes activas es muy baja comparada con ratones normales. Las células B pequeñas responden fácilmente a los lipopolisacáridos, lo que hace pensar que están genéticamente programadas para activarse fácilmente, y provocar una superproducción de anticuerpos. Un número significativo de células B CD5+ se encontró en los nódulos linfáticos de los ratones W/B F1 viejos. Todos estos hallazgos indican que las células B han sido activadas *in vivo*.<sup>51</sup>

McKenzie hace un modelo murino de púrpura inmune "humanizado". Para este modelo emplea ratones transfectados con el gene humano del receptor de inmunoglobulinas FcγRIIIa (CD32) (no existe la contraparte murina de este receptor) y ratones sin transfectar. Al inyectar el anticuerpo 4A5 (de rata contra plaquetas de ratón) se produce trombocitopenia moderada en los ratones normales y severa en los transfectados. Este estudio demostró la importancia de FcγRIIIa en la destrucción plaquetaria.<sup>52</sup>

En el experimento de Campbell, llamado "ratón Harrington", se trasplantaron células mononucleares de cordón umbilical humano a ratones que recibieron altas dosis de radiación para evitar el rechazo. Después de 4 semanas se demostró la presencia de plaquetas humanas en dichos ratones. Posteriormente se les administró un anticuerpo anti-plaquetas humanas por vía endovenosa, se observó trombocitopenia a las tres horas, de la cual se recuperaron cuatro días después. Este modelo puede ser de gran ayuda para estudiar la PTA humana en los ratones.<sup>53</sup>

### Mecanismos celulares y bioquímicos en humanos con PTA

En 1999 Louwes y colaboradores estudiaron 101 pacientes con PTA definiendo dos subgrupos. Uno de

ellos (59%) tenía las siguientes características: producción plaquetaria normal o aumentada, destrucción periférica aumentada, vida media de las plaquetas reducida a  $1.6 \pm 1.4$  días. Cuarenta y ocho de estos pacientes además tuvieron secuestro esplénico aumentado y 30 de 34 fueron sometidos a esplenectomía con remisión parcial o completa. Los del segundo grupo (41%) tenían: producción plaquetaria disminuida y vida media de las plaquetas más prolongada ( $3.6 \pm 2$  días) que los del grupo anterior. En este grupo, la respuesta a la esplenectomía fue menor (62%) y tenían producción defectuosa de megacariocitos en la médula ósea.<sup>54</sup>

Estos resultados nos conducen a reconsiderar la fisiopatología de la PTA. Se empezará por revisar el papel de los linfocitos en esta enfermedad.

### Linfocitos T

Hay muchos estudios relacionados con el papel de los autoanticuerpos en esta enfermedad autoinmune; sin embargo, se ha estudiado relativamente poco la inmunorregulación de las células T en cuanto a la producción de autoanticuerpos anti-plaqueta.<sup>55</sup>

Hay evidencia que sugiere que en la PTA crónica la producción de estos autoanticuerpos anti-plaqueta está bajo la influencia de varios mecanismos anormales mediados por linfocitos, por ejemplo una elevada actividad de Th (CD4+) con reducción concomitante de la actividad T supresora (CD8+).<sup>56-59</sup> Sin embargo, da la impresión de que las condiciones en la PTA aguda son diferentes y no

**Cuadro I. Resumen de características inmunológicas en la PTA aguda, crónica y crónica refractaria**

	PTA aguda	PTA crónica	PTA crónica refractaria
<i>Linfocitos T</i>			
Linfocitos T CD4+	actividad normal o reducida	actividad aumentada	
Linfocitos T CD8+	actividad normal	actividad reducida	
Linfocitos T TCR $\gamma\delta$ +		aumentados	
Proliferación con PHA, ConA, PWM	reducida	aumentada	reducida
<i>Linfocitos B</i>			
Linfocitos B CD5+		aumentados	
Genes más usados de IgG		VH6	
Detección de anticuerpos	difícil	difícil	difícil
<i>Células NK</i>			
Nivel de células NK		normal o reducido	aumentado
Actividad de células NK		normal	aumentada
<i>Citocinas séricas</i>			
IL-2	normal	aumentada	
sIL-2R	aumentado	aumentado	
M-CSF		normal	muy aumentado
IL-6	normal	normal	aumentada
IL-10	normal	aumentada	aumentada
IFN $\gamma$	normal	aumentado	aumentado
IL-11		aumentada	aumentada
TPO		normal o disminuida	disminuida
<i>Citocinas in vitro</i>			
<i>Células CD2+</i>			
IFN $\gamma$		normal	aumentada
TNF $\alpha$		normal	aumentada
IL-6		normal	normal
<i>Células mononucleares de sangre periférica</i>			
IL-2		nivel bajo	
IFN $\gamma$		nivel bajo	
IL-4		nivel elevado	
IL-10		nivel elevado	
P-Selectina		aumentada	aumentada

se ha encontrado predominio de algún fenotipo especial, o incluso puede haber disminución de CD4+.<sup>60-62</sup>

Se ha encontrado un número elevado de linfocitos TCR $\gamma\delta$ +. Existiendo una correlación positiva entre este heterodímero en la membrana de los linfocitos T y el grado de trombocitopenia. La presencia de este heterodímero puede ser importante en la patogénesis de la púrpura, por lo menos en algunos pacientes.<sup>63-65</sup> Los genes involucrados en el rearreglo del TCR son los genes Vb 3,6,10,13,1 y 14.<sup>66</sup>

La proliferación de linfocitos inducida por diferentes mitógenos (PHA, Con A, PWM) generalmente se encuentra elevada en los pacientes con PTA crónica, pero en los pacientes con PTA aguda se encuentra disminuida.<sup>60-61</sup> Los pacientes con PTA crónica que no responden al tratamiento con esteroides o esplenectomía tienen esta respuesta blastogénica reducida comparada con los pacientes que sí responden.<sup>62</sup>

La citocina IL-2 es producida por linfocitos T activados, su función es la de factor de crecimiento para otros linfocitos, además de estimular a otros linfocitos T, también estimula a linfocitos B para la producción de los anticuerpos.<sup>57,64</sup> En general, se ha encontrado aumento en la producción de IL-2 en la PTA aguda y crónica, aunque esta sobreproducción no se debe a un aumento en la cantidad de linfocitos T CD4+, sino a una actividad intrínseca diferente.<sup>61,63,67</sup>

Por último, se ha demostrado la interacción de células Th con células presentadoras de antígeno como el estímulo primario para la producción de anticuerpos anti-plaqueta en estos pacientes.<sup>68-70</sup>

### Linfocitos B

Los pacientes con PTA tienen anticuerpos que reconocen diferentes antígenos plaquetarios, principalmente los complejos GPIIb-IIIa, Ib-IX, Ia-IIa y otros.<sup>16,20</sup> No se conoce el mecanismo por el cual estos anticuerpos llevan a la disfunción de las células T supresoras, pero esta disfunción conduce a la perpetuación del fenómeno autoinmune. Algunos estudios han demostrado que este fenómeno puede corregirse con dosis repetidas de IgG, que al parecer aumenta la actividad T supresora.<sup>71-73</sup> Se ha visto que en los pacientes con anticuerpos contra GPIIb, la trombocitopenia es más severa y la respuesta a los esteroides es pobre. Esto puede deberse a que además de la IgG estos pacientes tienen IgM y C3 asociado a las plaquetas.<sup>74</sup> Los linfocitos B CD5+ son células inmaduras que secretan preferentemente anticuerpos IgG. En algunos pacientes con PTA crónica existe una correlación positiva entre el porcentaje de células B CD5+ y la cantidad de IgM asociada a las plaquetas. De aquí se especula que las células CD5+ juegan un papel muy importante en la producción de

autoanticuerpos. El tratamiento con dosis altas y repetidas de IgG intravenosa disminuye la cantidad de los linfocitos CD5+.<sup>75-77</sup>

En los estudios de citogenética de los pacientes con PTA no se encuentran diferencias en la utilización de genes VH y VK de las inmunoglobulinas, aunque hay algunos reportes de que se emplean más los genes de la familia VH6.<sup>78-79</sup>

Finalmente, ha sido muy difícil demostrar la presencia de anticuerpos antiplaquetas en el suero de los pacientes con PTA. Tal vez se deba a que son anticuerpos de baja afinidad, por lo que se han usado, con poco éxito, una serie de procedimientos para mejorar la detección.<sup>75</sup> Además no se ha encontrado una correlación ni entre la cantidad de anticuerpo asociado a las plaquetas y la cantidad de anticuerpos en el suero, ni entre la trombocitopenia y la presencia de púrpura.<sup>75-80</sup>

### Células asesinas naturales (NK)

Resulta muy difícil establecer el papel que juegan las células NK en la fisiopatología de la púrpura. Algunos autores han encontrado actividad NK citotóxica reducida en PTA crónica idiopática y PTA secundaria.<sup>55-81</sup> Pero otros han encontrado que los pacientes con PTA crónica estable tienen niveles normales de estas células, mientras que aquellos pacientes que tienen púrpura activa presentan un aumento en el número de células NK y este aumento es más acentuado en los pacientes refractarios al tratamiento con esteroides o esplenectomía. Además del aumento en cantidad, también está incrementada la respuesta proliferativa de estas células.<sup>61,82-84</sup>

La menor actividad NK en un grupo de pacientes con PTA crónica aumentó después de la terapia con IFN $\alpha$ .<sup>81</sup> En un paciente que estaba recibiendo tratamiento con danazol se observó una fluctuación cíclica de su cuenta plaquetaria cada cuatro semanas, se encontró correlación entre el aumento de la cuenta de plaquetas y el aumento en la actividad de las células NK.<sup>85</sup>

### Citocinas

Ya se ha mencionado que los linfocitos T activados secretan varias citocinas. De éstas se ha seleccionado IL-2 para identificar el estadio activado de las células T. La producción de citocinas se ha estudiado en células *in vitro*, en el sobrenadante de los cultivos celulares y en el suero o plasma de los pacientes. De esta forma se tienen resultados un tanto contradictorios, con niveles disminuidos, normales o aumentados dependiendo si el estudio se realizó *in vivo* o *in vitro*.

Los niveles plasmáticos de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) se encuentran normales en los pacientes con PTA crónica estable, mode-

radamente aumentados en los pacientes con PTA activa, y muy aumentados en aquéllos con PTA severa y refractaria. Cuando los pacientes reciben tratamiento con IgGIV a altas dosis el factor M-CSF disminuye ligeramente y las cifras de plaquetas aumentan. Estos resultados sugieren que M-CSF puede influenciar la destrucción plaquetaria en los pacientes con PTA al aumentar la cantidad de macrófagos.<sup>86</sup> Los niveles de IL-6 correlacionan con los niveles de M-CSF, y cuando este factor disminuye, los niveles de IL-6 también disminuyen significativamente. Estos resultados sugieren que altas dosis con IgGIV abaten la destrucción plaquetaria por disminución de estas dos citocinas.<sup>87-90</sup>

Un alto porcentaje (53%) de niños con PTA crónica a diferencia de niños con PTA aguda (9%) tenían niveles séricos aumentados de IL-2, IFN $\gamma$  e IL-10, y no tenían niveles detectables de IL-4 ni IL-6, lo cual sugiere una activación temprana de Th0 y Th1. Esto sugiere que existen diferencias en la patogénesis de la PTA aguda y crónica, particularmente al nivel de células T reactivas.<sup>67</sup> Tal vez se trata de etapas diferentes de un mismo camino fisiopatológico.

Se ha postulado que la respuesta de citocinas en la PTA crónica es tipo Th1 ya que los niveles séricos de IL-2, IFN $\gamma$  e IL-11 están elevados; mientras que IL-4 está disminuida. El aumento de IL-11 puede deberse a la gran cantidad de plaquetas que se están produciendo por megacariocito.<sup>91</sup> También el receptor soluble de IL-2 (sIL-2R) está aumentado en el plasma de los pacientes con PTA aguda o crónica, y no responde al tratamiento con metilprednisolona en pacientes con PTA crónica. No hubo correlación de este receptor con la cuenta de plaquetas ni antes ni después del tratamiento.<sup>92</sup>

El tratamiento con IgG anti-D no modifica los niveles séricos de citocinas y tampoco afecta las poblaciones de linfocitos ni el repertorio del TCR; es decir este anticuerpo únicamente bloquea el sistema retículo endotelio.<sup>35,93</sup>

Los estudios *in vitro* de la producción de citocinas en células CD2+ de sangre periférica en pacientes con PTA crónica en fase activa muestran que hay producción aumentada de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  (estimuladas con PHA) comparados con pacientes con PTA crónica estable. No hubo diferencias significativas en la producción de IL-6. La severidad clínica de esta enfermedad correlaciona con la secreción alterada de citocinas por células CD2+.<sup>83</sup>

Las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con PTA crónica en cultivo (estimuladas con PHA) secretan niveles bajos de IL-2 e IFN $\gamma$ , y niveles elevados de IL-4 e IL-10. Después del tratamiento con IFN $\alpha$  se corrigen los valores de todas estas citocinas.

Esta corrección se ve reflejada en la disminución de los anticuerpos anti-GPIIb-IIIa asociados a las plaquetas, así también como en la reducción del alto porcentaje de células T con TCR $\gamma\delta$ .

Estos resultados son consistentes con un aumento en actividad Th1 y disminución en la actividad Th2.<sup>81</sup>

La trombopoyetina puede estar normal o disminuida en los pacientes con PTA, pero aumentada en los pacientes con otras causas de trombocitopenia no inmunológicas.<sup>88,94</sup> Se han observado niveles disminuidos de TPO y aumentados de IL-6 y P-selectina en estos pacientes antes del tratamiento con esteroides. Después del tratamiento se normalizan todos los valores. TPO puede estar disminuida por la masa incrementada de megacariocitos, IL-6 puede estar aumentada para compensar la megacariocitopoyesis/trombopoyesis y el aumento de P-selectina puede reflejar una compensación de hiperactividad plaquetaria o puede ser un marcador de la destrucción.<sup>95</sup>

### *Medio ambiente*

Dos hechos apoyan la caracterización de la PTA como un trastorno inmunitario. Primero, los anticuerpos en contra de las plaquetas a menudo aparecen después de una infección viral o bacteriana provocando la eliminación de estas células. La enfermedad viral puede cambiar la respuesta inmune compleja del hospedero a diferentes niveles y en las infecciones bacterianas se da el fenómeno de adherencia inmune.<sup>96</sup> Segundo, una mezcla de inmunoglobulinas de donadores sanos (IgGIV) suministrada al paciente, puede influenciar el desbalance de la respuesta inmunitaria en PTA.<sup>73,97</sup>

En relación con infección viral se han reportado varios ejemplos de mimetismo molecular entre proteínas virales y proteínas humanas. Es particularmente importante el mimetismo entre proteínas del VIH-1 y plaquetas humanas, ya que los anticuerpos dirigidos contra las proteínas de virus dan reacción cruzada con las proteínas plaquetarias jugando un papel en la trombocitopenia que se presenta en algunos de los pacientes VIH+.<sup>98-102</sup> En la colitis ulcerativa se ha presentado púrpura secundaria, y se ha podido demostrar la presencia de anticuerpos unidos a las plaquetas, que desaparecieron después de la remisión de la colitis. Se piensa que hay inmunostimulación por antígenos lumenales de la mucosa intestinal y una inmunoregulación alterada o tal vez mimetismo molecular.<sup>103</sup>

### *Tratamiento con anticuerpos*

A pesar de que no se sabe como funciona la IgGIV en ésta y otras enfermedades autoinmunes, el tratamiento de la PTA con dosis elevadas de inmunoglobulinas G por vía endovenosa (IgGIV) es útil en casos de pacientes refractarios a otros tratamientos.<sup>34,36-37</sup> Se piensa que actúa modificando la relación de linfocitos CD4/CD8 disminuyendo los linfocitos CD4+.

dos sugieren que durante el tratamiento la población CD4+ es influenciada resultando en activación reducida de células B dependientes de linfocitos T,<sup>104</sup> además de la disminución en la cantidad de linfocitos CD5+ (*vide supra*).<sup>75-77</sup> También se piensa que producen un bloqueo de los receptores Fc de los macrófagos, inhibiéndose así la destrucción del complejo plaqueta-anticuerpos.<sup>4,6,7,32,105-108</sup>

Por la metodología llamada "*phage display*" se seleccionaron anticuerpos de pacientes con PTA que se unieron a las IgG's usadas como tratamiento. Las secuencias moleculares de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera mostraron extensas mutaciones en los CDR, y dos fueron idénticas a genes germinales, que son usados por muchos otros autoanticuerpos. Estos resultados implican una interacción específica de IgIV con autoanticuerpos del suero y el receptor de células  $\beta$ ( $\beta$ CR) derivados de genes germinales muy relacionados con la generación de autoanticuerpos. Es decir hay interacción específica entre los idiotipos de los anticuerpos de los pacientes y los anticuerpos anti-idiotipo presentes en las preparaciones de IgIV.<sup>109</sup>

Otro anticuerpo que se usa como tratamiento es IgG anti-D,<sup>29-39</sup> que se cree que funciona bloqueando al sistema retículo endotelial,<sup>32,105</sup> ya que no afecta las poblaciones de linfocitos, ni el repertorio del TCR, y tampoco la producción de citocinas.<sup>93</sup>

Una paciente de 44 años con PTA refractaria recibió tratamiento con un anticuerpo monoclonal murino (197 subclase IgG2a) que se une a dos distintos epítopes de Fc $\gamma$ RI (CD64) de la membrana de los macrófagos, resultando en entrecruzamiento y modulación de este receptor. A pesar de que se obtuvo mejoría clínica con resolución de equimosis orales y epistaxis desde la primera administración del anticuerpo, no se observó cambio en la cuenta de plaquetas después de 5 días de tratamiento. La paciente tuvo monocitopenia que duró los 5 días de tratamiento, y revirtió después de administrar IgIV.<sup>110</sup> También se ha usado anti Fc $\gamma$ RIII (CD16), este anticuerpo logró bloquear la fagocitosis plaquetaria por los macrófagos.<sup>111</sup>

#### *Tratamiento con interferón alfa (IFN $\alpha$ )*

Existen muchos reportes del éxito que tiene el tratamiento con IFN $\alpha$  en los pacientes con PTA crónica y refractaria a los tratamientos convencionales (alrededor del 30 al 70% de los pacientes responden). También se ha usado en la PTA asociada a SIDA. Aunque en la mayoría no se mencionan reacciones colaterales, en algunos casos se ha observado la presencia de fiebre.<sup>112-121</sup>

El IFN $\alpha$  produce disminución de la cantidad de anticuerpos antiplaqueta<sup>113</sup> y aumento de la vida media

de las plaquetas,<sup>117</sup> sin cambiar los niveles de linfocitos T CD4+.<sup>107</sup> Sin embargo, también se ha reportado que no tiene ningún efecto<sup>122</sup> y que incluso puede presentarse PTA como reacción secundaria en el tratamiento de la hepatitis C con esta citocina.<sup>123</sup>

#### **Discusión**

Las características de evolución de los síndromes de PTA aguda y crónica son:

- a. Variación en el título de anticuerpos en relación directa con las manifestaciones hemorrágicas.
- b. Variación de la secreción de citocinas también en relación con la actividad hemorrágica. Estos resultados permiten suponer que el estímulo que lo produce está presente y activo en las etapas con mayor "actividad hemorrágica". La interacción entre las células T y  $\beta$  favorece la destrucción al aumentar las clonas de células activadas, con secreción de citocinas y aumento correspondiente de los receptores de citocinas en las células T y de receptores de inmunoglobulinas en los macrófagos.

La observación de un efecto aparentemente directo de la globulina gamma anti-D (en pacientes D positivos) y de los eritrocitos opsonizados con anticuerpo anti-D, sobre receptores Fc y probablemente de complemento de la membrana de los macrófagos, en un número substancial de casos de PTA crónica refractaria,<sup>32</sup> con la mejoría de la cifra de plaquetas y de los signos hemorrágicos sugiere bloqueo de estos receptores. Este bloqueo no es suficiente para lograr la remisión completa, por lo que podemos hipotetizar que el estímulo crónico que activa la autoinmunidad persiste y que estimula también otras formas de destrucción plaquetaria con producción de IgM fijadora de complemento y destrucción intravascular o la participación de otras células ubicadas en el hígado, o la destrucción por células NK.

Los complejos inmunes de plaqueta + virus o bacteria, en alguna forma aún no aclarada pueden tener afinidad por las proteínas de la membrana plaquetaria (IIb-IIIa, etc) que pueden jugar un papel fisiológico en la eliminación de estos complejos y que en los casos en que su función es superada por exceso de antígeno microbiano, los receptores IIb-IIIa quedan expuestos a la acción del anticuerpo anti complejo plaqueta-microbio.

Probablemente, mientras no se encuentren otras formas de tratamiento que rompan la secuencia: agente estimulante  $\rightarrow$  producción de anticuerpos  $\rightarrow$  formación de complejo Ag-microbiano+ Ag-plaquetario  $\rightarrow$  destrucción por fagocitosis, no se alcanzará la remisión completa de los casos crónicos refractarios. Los casos agudos (no fulminantes), como se ha observado, en su

mayoría remiten espontáneamente, podríamos hipotetizar que en ellos la concatenación: estímulo → producción de anticuerpos → fagocitosis, ocurre de manera equilibrada y el sujeto expuesto finalmente logra recuperar su homeostasis.

A pesar de los esfuerzos para estudiar el mecanismo o mecanismos bioquímicos que llevan, por una parte, al desorden inmunitario y por otra a la destrucción plaquetaria en la PTA, todavía no hay la información necesaria para dilucidar el fenómeno.

Los estudios en humanos muestran resultados muy contradictorios y los modelos en ratón todavía no están bien caracterizados. Los resultados contradictorios de los estudios en humanos son resultado de que abarcan sólo una pequeña población de pacientes. Algunos reportan los resultados de un solo paciente y algunos otros incluyen de tres a 30 pacientes cuando más. Además de la dificultad que representa poder contar con pacientes vírgenes a los tratamientos y lo que ocurre con cada uno de éstos. Los modelos en ratón, si bien son una ayuda, tienen grandes desventajas. Por una parte los ratones W/BF1 tienen una enfermedad autoinmune de fondo, por lo que son modelo de PTA secundaria. A pesar de la homología que puede haber entre las proteínas de las plaquetas murinas y las plaquetas humanas, así como las proteínas de las células del sistema inmune, no son del todo comparables. Por ejemplo, los ratones no tienen la contraparte del receptor FcγRII en los macrófagos. Se ha tratado de superar estas desventajas con la creación de los modelos "humanizados" de púrpura inmune, pero todavía hacen falta más estudios.

### Conclusiones

Las observaciones clínicas en el hombre permiten distinguir varios hechos:

1. La PTA puede ser de evolución aguda o crónica.
2. La forma aguda en niños, evoluciona a la curación espontáneamente en una proporción de 80% o más de los casos.
3. La forma crónica se observa en mayor proporción en el adulto. En ellos 20% se transforma en crónica refractaria, en tanto no remitan con el tratamiento medicamentoso ni con la esplenectomía.
4. Podemos suponer que el estímulo para la formación de autoanticuerpos es un complejo Ag-microbiano+ receptor IIb-IIIa de las plaquetas, que mientras el agente infectante persista, por superación de los mecanismos de depuración del paciente, dará lugar a la cronicidad del síndrome.
5. Es deseable, pero éticamente imposible estudiar la evolución natural de la PTA en humanos, sin tratamiento, para conocer específicamente la patogenia de este síndrome.

### Referencias

1. **George JN.** Thrombocytopenia due to enhanced platelet destruction by immunologic mechanisms. In: Williams Hematology, Fifth edition (E. Beutler, M Lichtman, B Collier and T Kipps eds) 1995 Pp 1315-1355. McGraw-Hill, New York.
2. **Frederiksen H, Schmidt K.** The incidence of idiopathic purpura in adults increase with age. *Blood* 1999;94:909-913.
3. **Wendell FR.** Treatment of chronic immune thrombocytopenia. *Clin Hematol* 1983;12:267-284.
4. **Pizzuto J, Ambriz R.** Therapeutic experience on 934 adults with ITP: multicentric trial of the cooperative Latin American Group in hemostasis and thrombosis. *Blood* 1984;64:1179-1183.
5. **Schwartz RS.** Autoimmunity and autoimmune diseases. In: Fundamental Immunology. Paul W E. Ed) Raven Press LTD. 3a Edición New York 1993 PP 1075.
6. **Sandier SG.** The spleen and splenectomy in immune (idiopathic) thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2000;37 (suppl 1):10-12.
7. **Chadburn J.** The spleen: anatomy and anatomical function. *Semin Hematol* 2000;37(suppl 1):13-21.
8. **George JN, Mayez A, El-Harake, Gary ER.** Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1994;331:1207-1211.
9. **van Leeuwen EF, van der Ven JTHM, Engelfriet CP, van dem Borne.** Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 1982;59:23-26.
10. **Beardsley DS, Spiegel JE, Jacobs MM, Handin RI, Lux IV SE.** Platelet membrane glycoprotein contains target antigens that bind anti-platelet antibodies in immune thrombocytopenias. *J Clin Invest* 1984;74:1701-1707.
11. **Tsubakio T, Tani P, Woods VL Jr, Mcmillan R.** Autoantibodies against platelet GPIIb/IIIa in chronic ITP react with different epitopes. *Br J Haematol* 1987;67:345-348.
12. **McMillan R, Tani P, Millard F, Berchtold L, Renshaw L, Woods VL.** Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood* 1987;70:1040-1045.
13. **Kekomaki R, Dawson B, McFarland J, Kunicki TJ.** Localization of human platelet autoantigens to the cysteine-rich region of glycoprotein IIIa. *J Clin Invest* 1991;88:847-854.
14. **Fujisawa K, Tani P, O'Toole TE, Ginsberg MH, McMillan R.** Different specificities of platelet-associated and plasma autoantibodies to platelet gpIIb-IIIa in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 1992;79:1441-1446.
15. **Fujisawa K, Tani P, McMillan R.** Platelet-associated antibody to glycoprotein IIb/IIIa from chronic immune thrombocytopenic purpura patients often binds to divalent cation-dependent antigens. *Blood* 1993;81:1284-1289.
16. **Berchtold P, McMillan R, Tani P, Sommerville-Nielsen S, Blanchette KS.** Autoantibodies against platelet membrane glycoproteins in children with acute and chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 1989;74:1600-1602.
17. **Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, Moore CV.** Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med* 1951;38:45-49.
18. **Shulman NR, Jordan JV Jr.** Platelet immunology. In: Hemostasis and Thrombosis. 2nd ed. Edited by Colman R.W. J.B. Lippincott Co. Philadelphia. 1987; PP 493-509.
19. **Mollison PL, Engelfried R, Contreras M.** Immunology of leucocytes, platelets and plasma components, in "Blood



- transfusion in clinical medicine". Ninth edition. Blackwell Scientific Publications. 1993;PP 617-632.
20. **Berchtold P, Wenger M.** Autoantibodies against platelet glycoproteins in autoimmune thrombocytopenic purpura: their clinical significance and response to treatment. *Blood* 1993;81:1246-1250.
  21. **Kelton J, Gibbons S.** Autoimmune platelet destruction: ITP. *Semin Thromb Hemost* 1982;8:83-104
  22. **Karpatkin S.** Autoimmune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 1985;22:260-288.
  23. **Waters AH.** Autoimmune thrombocytopenia: Clinical aspects. *Semin Hematol* 1992;29:18-25.
  24. **Oksenhendler E, Bierling P, Chevret S, Defraissy JF, Laurian Y, Clauvel JP.** Splenectomy is safe and effective in human immunodeficiency virus-related immune thrombocytopenia. *Blood* 1993;82:29-32.
  25. **Aster RH, George JN.** Thrombocytopenia due to enhanced platelet destruction by immunologic mechanisms. In: *Williams Hematology*. Williams J, Beutier E, Lichtchman, Collier (Eds) McGraw-Hill Inc. 5a. Edición New York PP 1995, Pp 1370-1384.
  26. **George JN.** Platelet IgG: measurement, interpretation and clinical significance. In: *Progress in Hemostasis and Thrombosis*. Collier BS (Ed) Saunders WB. Edición Philadelphia 1991 PP 97-126.
  27. **Karpatkin S.** Autoimmune (idiopathic) thrombocytopenic purpura. *Lancet* 1997;349:1531-1536.
  28. **George JN, Woolf SH, Raskob GE, Wasser JS Medort LM, Ballem PJ, et al.** Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 1996;88:340
  29. **Lichtin A.** The ITP practice guideline: what, why and for whom? *Blood* 1996;88:1-2.
  30. **Andersen JC.** Response of resistant idiopathic thrombocytopenic purpura to pulsed high-dose dexamethasone therapy. *N Engl J Med* 1994;330:1560-1564.
  31. **Giovanni E, Messori C, Longo G, Bertesi M.** Long-term salvage treatment by cyclosporin in refractory autoimmune haematological disorders. *Br J Haematol* 1996;93:341-344.
  32. **Ambríz R, Muñoz R, Pizzuto J, Quintanar E, Morales M, Avilés A.** Low-dose autologous *in vitro* opsonized erythrocytes. *Arch Intern Med* 1987;147:105-108.
  33. **Letsky EA, Greaves M.** Guidelines on the investigation and management of thrombocytopenia in pregnancy and neonatal autoimmune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1996;95:21-26.
  34. **Bussel JB.** Splenectomy-sparing strategies for the treatment and long-term maintenance of chronic idiopathic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2000;37(suppl 1):1-4.
  35. **Bennett CL, Weinberg PD, Goloub RM, Bussel JB.** The potential for treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura with anti-D to prevent splenectomy: a predictive cost analysis. *Semin Hematol* 2000;37(suppl 1):26-30.
  36. **George JN.** Treatment options for chronic idiopathic (immune) thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2000;37(suppl 1):31-34.
  37. **Tarantino MD.** Treatment options for chronic immune (idiopathic) thrombocytopenic purpura in children. *Semin Hematol* 2000;37(suppl 1):35-41.
  38. **Scaradavou A.** Splenectomy-sparing, long-term maintenance with anti-D for chronic immune (idiopathic) thrombocytopenic purpura: the New York Hospital experience. *Semin Hematol* 2000;37(suppl 1):42-44.
  39. **Waintraub SE, Brody JI.** Use of anti-D in immune thrombocytopenic purpura as a means to prevent splenectomy: case reports from two university hospital medical centers. *Semin Hematol* 2000;37(suppl 1):45-49.
  40. **Ishihara T, Akizuki S, Yamamani S, Yamashita Y, Yokota T, Okusono Y, Takahashi M, Kamei T, Uchino F, Matsumoto N.** Foamy cells in spleens and in granulomas induced by murine platelets, commercialized phospholipids, and erythrocyte membrane. *Histological and ultrastructural studies. Acta Pathol Jpn* 1983;33:943-958.
  41. **Ishihara T, Akizuki S, Yokota T, Takahashi M, Uchino F, Matsumoto N.** Foamy cells associated with platelet phagocytosis. *Am J Pathol* 1984;114:104-111.
  42. **Corash L, Chen H.Y, Levin J, Baker G, Lu H, Mok Y.** Regulation of thrombopoiesis: effects of the degree of thrombocytopenia on megakaryocyte ploidy and platelet volume. *Blood* 1987; 70:177-185.
  43. **Stenberg PE, Levin J.** Ultrastructural analysis of acute immune thrombocytopenia in mice: dissociation between alterations in megakaryocytes and platelets. *J Cell Physiol* 1989; 141:160-169.
  44. **Oyaizu N, Yasumizn R, Miyama-Inaba M, Nomura S, Yoshida H, Miyawaki S, Shibata Y, Mitsuoka S, Yasunaga K, Moni S, Good R, Ikehara S.** (NZW x BXSb) F1 Mouse: a new animal model for idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Exp Med* 1988; 167: 2017-2022.
  45. **Hang L, Izui MS, Dixon FJ.** (NZW x BXSb) F1 hybrid: a model of acute lupus and coronary vascular disease with myocardial infarction. *J Exp Med* 1981;154:216-221.
  46. **Mizutani H, Furubayashi T, Kuriu A, Take II, Tmiyama Y, Yoshida H, Nakamura Y, Inaba M, Kurata Y, Yonezawa T, Tarui S, Ikehara S.** Analyses of thrombocytopenia in idiopathic thrombocytopenic purpura-prone mice by platelet transfer experiments between (NZW x BXSb)F1 and normal mice. *Blood* 1990;75:109-1812.
  47. **Nlizutani H, Furubayashi T, Kashiwagi II, Honda S, Kurata Y, Yonezawa T, Tarui S, Ikehara S.** Effects of splenectomy on immune thrombocytopenic purpura in (NZW x BXSb) F1 mice: analyses of platelet kinetics and anti-platelet antibody production. *Thromb Haemost* 1992; 67:563-566.
  48. **Mizutani H, Furubayashi T, Imai Y, Kashiwagi H, Honda S, Kurata Y, Yonezawa T, Tarui S, Ikehara S.** Mechanisms of corticosteroid action in immune thrombocytopenic purpura (ITP) experimental studies using ITP-prone mice, (NZW x BXSb) F1. *Blood* 1992;79:942-947.
  49. **Nemoto K, Mae T, Saiga K, Matsumura E, Koike T.** Autoimmune-prone (NZW x BXSb) F1 mice escape severe thrombocytopenia after treatment with deoxispermualin, an immunosuppressant. *Br J Haematol* 1995;91:691-696.
  50. **Mizutani H, Engelman RW, Kurata Y, Ikehara S, Good RA.** Energy restriction prevents and reverses immune thrombocytopenic purpura (ITP) and increases life span of ITP-prone (NZW x BXSb) F1 mice. *J Nutr* 1994;124:2016-2023.
  51. **Adachi Y, Inaba M, Inaba K, Nagata N, Kobayashi Y, Ikehara S.** Functional analyses of B cells in (NZW x BXSb) F1 mice. *Blood* 1993;82:837-844.
  52. **McKenzie SE, Taylor SM, Reilly MP, Surrey S, Schwartz E.** Immune-mediated thrombocytopenia is more severe in human FcγR1a transgenic mice than in wild type mice. *Blood* 1997;90(suppl 1):465.
  53. **Campbel D, Beardsley DS, Tang C, Ertem M, Rockwell S, Kelley M.** The "Harrington mouse": an animal model

- for human immune thrombocytopenia. *Blood* 1997;90 (suppl 1):460.
54. **Louwes H, Zeinali Lathori OA, Vellenga E, de Wolf JT.** Platelet kinetic studies in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Med* 1999;106:430-434.
  55. **Semple JW, Lazarus AH, Freedman J.** The cellular immunology associated with autoimmune thrombocytopenic purpura: an update. *Transfus Sci* 1998;19:245-251.
  56. **Semple JW, Freedman J.** Increased antiplatelet T helper lymphocyte reactivity in patients with autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 1991;78:2619-2625.
  57. **Semple JW, Freedman J.** Cellular immune mechanisms in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura (ATP). *Autoimmunity* 1992;13:311-319.
  58. **Furubayashi T, Mizutani H, Take H, Honda S, Torniyama Y, Katagiri S, Tamaid T, Tsubakio T, Kurata Y, Yonezawa T.** Impaired suppressor function of T cells induced by autologous mixed lymphocyte reaction in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta Haematol.* 1992;87:32.3-6.
  59. **Ware RE, Howard TA.** Phenotypic and clonal analysis of T lymphocytes in childhood immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 1993;82:2137-2142.
  60. **Koyanagi H, Kishida K, Shimoinura K, Kurokawa M, Deguchi T, Shimoda Y.** Immunological study of childhood acute ITP at onset. *Pediatr Hematol Oncol* 1992;9:11-19.
  61. **García-Suárez J, Prieto A, Manzano L, Reyes E, Molto L, Alvarez-Mon M.** T lymphocytes from autoimmune thrombocytopenic purpura show a defective activation and proliferation after cytoplasmic membrane and intracytoplasmic mitogenic signals. *Am J Hematol* 1993;44:1-8.
  62. **García-Suárez J, Prieto A, Reyes E, Manzano L, Merino JL, Mvarez-Mon M.** The clinical outcome of autoimmune thrombocytopenic purpura patients is related to their T cell immunodeficiency. *Br J Haematol* 1993;84:464-470.
  63. **Ware RE, Howard TA.** Elevated numbers of gamma-delta ( $\gamma\delta$ +) T lymphocytes in children with immune thrombocytopenic purpura. *J Clin Immunol* 1994;14:237-247.
  64. **Silirmomura T, Fujimura K, Takafuta T, Fujil T, Katsutani S, Noda M, Fujimoto T, Kuramoto A.** Oligoclonal accumulation of T cells in peripheral blood from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1996;95:732-737.
  65. **Hedlund-Treutiger I, Wahlstrom J, Elinder G.** Role of the T cell receptor in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Acta Paediatr Suppl* 1998;424:46-50.
  66. **Kuwana M, Kaburaki J, Ikeda Y.** Autoreactive T cells to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic purpura. Role in production of antiplatelet autoantibody. *J Clin Invest* 1998;102:1393-11402.
  67. **Semple JW, Milev Y, Cosgrave D, Mody M, Hornstein A, Blanchette V, Freedman J.** Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: relationship to platelet phenotype and antiplatelet T-cell reactivity. *Blood* 1996;87:4245-4254.
  68. **Semple JW.** Immunobiology of T helper cells and antigen-presenting cells in autoimmune thrombocytopenic purpura (ITP). *Acta Paediatr Suppl* 1998;424:41-45.
  69. **Lazarus AH, Joy T, Crow AR.** Analysis of transmembrane signalling and T cell defects associated with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Acta Paediatr Suppl* 1998;424:21-25.
  70. **Ikehara S, Kawamura M, Takao F, Inaba M, Yasurnizu R, Than S, Hisha H, Sugiura K, Koide Y, Yoshida TO.** Organ-specific and systemic autoimmune diseases originate from defects in hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8341-8344.
  71. **Hymes KB, Karparkin S.** *In vitro* suppressor T lymphocyte dysfunction in autoimmune thrombocytopenic purpura associated with a complement-fixing antibody. *Br J Haematol* 1990;74:330-335.
  72. **Pogliani EM, Della Volpe A, Casaroli Y, Maffe PF, Corneo G.** Lymphocyte subsets in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura during high-dose gamma globulin therapy. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1991;19:113-116.
  73. **Imbach PA.** Harmful and beneficial antibodies in immune thrombocytopenic purpura. *Clin Exp. Immunol.* 1994;97(Suppl1):25-30.
  74. **Nomura S, Yanabu M, Soga T, Kido H, Fukuroi T Yamaguchi K, Nagata H, Kokawa T, Yasunaga K.** Analysis of idiopathic thrombocytopenic purpura patients with anti-glycoprotein IIb/IIIa or Ib autoantibodies. 1991;86:25-30.
  75. **Iyon H, Fujisawa K, Akatsuka J.** Autoantibodies and CD+ B cells in childhood immune thrombocytopenic purpura. *Acta Paediatr Jpn* 1995;37:325-330.
  76. **Mizutani K, Azuma E, Komada Y, Ito M, Sakurai M, Hironaka T, Hirai K.** An infantile case of cytomegalovirus induced idiopathic thrombocytopenic purpura with predominant proliferation of CD10 positive lymphoblast in bone marrow. *Acta Paediatr Jpn* 1995;37:71-74.
  77. **Callea V, Cornis M, Iaria G, Sculli G, Morabito F, Lombardo VT.** Clinical significance of H'a-DR+, CD 19+, CD 10+ immature B-cell phenotype and CD34+ cell detection in bone marrow lymphocytes from children affected with Immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica* 82:471-473.
  78. **Denomme GA, Mahmoudi M, Cairns E, Bell DA.** Immunoglobulin V region sequences of two human antiplatelet monoclonal autoantibodies derived from B cells of normal origin. *J Autoimmun* 1994; 7: 521-535.
  79. **van Dijk-Hard Y, Feld S, Holmberg D, Lundkvist Y.** Increased utilization of the VH6 gene family in patients with autoimmune idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Autoimmun* 1999, 12: 57-63.
  80. **Yang YY, Fischer P, Leu SJ, Zhu M, Woods VL, Chen PP.** Possible presence of enhancing antibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1999; 104: 69-80.
  81. **Crossley AR, Dickinson AM, Proctor SJ, Calvert JE.** Effects of interferon-alpha therapy on immune parameters in immune thrombocytopenic purpura. *Autoimmunity* 1996; 24: 81-100.
  82. **García-Suarez J, Prieto A, Reyes E, Manzano L, Arribalzaga K, Alvarez-Mon M.** Abnormal gamma IFN and alpha TNF secretion in purified CD2+ cells from autoimmune thrombocytopenic purpura (ATP) patients: their implication in the clinical course of the disease. *Am J Hematol* 1995; 49: 271-276.
  83. **García-Suarez J, Prieto A, Reyes E, Manzano L, Arribalzaga K, Perez-Machado MA, Lopez-Rubio M, Manzano L, Alvarez-Mon M.** Persistent lymphocytosis of natural killer cells in autoimmune thrombocytopenic purpura (ATP) patients after splenectomy. *Br J Haematol* 1995; 89: 653-655.
  84. **García-Suarez J, Prieto A, Reyes E, Manzano L, Merino JL, Alvarez-Mon M.** Severe chronic autoimmune thrombocytopenic purpura is associated with an expansion of CD56+ CD3- natural killer cells subset. *Blood* 1993; 82: 1538-1545.
  85. **Otawa M, Kuriyama Y, Iwase O, Kawanishi Y, Miyazawa K, Aizawa S, Nehashi Y, Nakano M, Toyama K.** Possible role of immunocompetent cells on periodic exacerbation of

- idiopathic thrombocytopenic purpura. *Rinsko Ketsueki* 1997; 38: 331-335.
86. **Zeigler ZR, Rosenfeld CS, Nemunaitis JJ, Besa EC, Shadduck RK.** Increased macrophage colony-stimulating factor levels in immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 1993; 81: 1251-1254.
  87. **Nomura S, Yasunaga K, Fujimura K, Kuramoto A, Okuma M, Nomura T.** High-doses intravenous gamma globulin reduces macrophage colony-stimulating factor levels in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 1996; 63: 227-234.
  88. **Kosar A., Haznedaroglu I.C., Buyukasik Y., Ozcebe O., Kirazli S., Dundar S.** Circulating thrombopoietin and interleukin-6 in newly diagnosed autoimmune versus aplastic thrombocytopenia. *Haematologica* 1998; 83: 1055-1056.
  89. **Haznedaroglu IC, Buyukasik Y, Kosar A, Kirazli S, Dundar SV.** Thrombopoietin, interleukin-6 and P-selectin at diagnosis and during post-steroid recovery period of patients with autoimmune thrombocytopenic purpura. *Am Haematol* 1998;77:165-170.
  90. **Anderson J.** Cytokines in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Acta Paediatr* 1998;424 (suppl 1):61-64.
  91. **Imbach P, Kuhne T.** Immune thrombocytopenic purpura. *Vox Sang* 1998;74(suppl 2):309-314.
  92. **Erduran E, Asian Y, Miyazicoglu Y, Mocan H, Gedik Y.** Plasma soluble interleukin-2 receptor levels in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 1998;57:119-123.
  93. **Zirnerman SA, Malinoski FJ, Ware RE.** Immunologic effects of anti-D (WinRho-SD) in children with immune thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 1998;57:131-138.
  94. **Cremer M, Schulze H, Linthorst G, Folman CC, Wehnert S, Strauss G, von dem Borne AE, Welte K, Bailmayer M.** Serum levels of thrombopoietin, IL-11, and IL-6 in pediatric thrombocytopenias. *Am Hematol* 1999;78:401-407.
  95. **Haznedaroglu IC, Buyukasik Y, Kosar A, Ozcebe OI, Kirazli S, Dundar S.** Selectins and IL-6 during the clinical course of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta Haematol* 1999;101:16-2.
  96. **Grabar P.** Autoantibodies and the physiological role of immunoglobulins. *Immunol Today* 1983;4:337.
  97. **Moller E.** Mechanisms for induction of autoimmunity in humans. *Acta Paediatr Suppl* 1998;424:16-20.
  98. **Hohmann AW, Booth K, Peters V, Gordon DL, Comacchio RM.** Common epitope on HW p24 and human platelets. *Lancet* 1993;342:127-1275.
  99. **Bettaieb A, Fromont P, Louache F.** Presence of cross-reactive antibody between human immunodeficiency virus (HIV) and platelet glycoproteins in HW-related immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 1992;80:162-169.
  100. **Bettaieb A, Oksenhendler E, Duedan N, Bierling P.** Cross reactive antibodies between Hw-gp 120 and platelet gpIIIa (CD61) in Hw-related immune thrombocytopenic purpura. *Clin Exp Immunol.* 1996;103:19-23.
  101. **Dornínguez V, Gevorkian G, Govezensky T, Rodríguez II, Viveros M, Cocho G, Macotela Y, Masso F, Pacheco M, Estrada JL, Lavalle C, Larralde C.** Antigenic homology of HIV-1 gp41 and human platelet glycoprotein gpIIIa (integrin  $\beta$ 3). *J Acq Inun Def Syn Hum Retrovir* 1998;17:385-390.
  102. **Marti M, Feliu E, Campo E, Palacin A, Berga L, Casals FJ, Urbano Ispizua A, Cardesa A, Rozman C.** Comparative study of spleen pathology in drug abusers with thrombocytopenia related to human immunodeficiency virus infection and in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. A morphometric, immunohistochemical, and ultrastructural study. *Am J Clin Pathol* 1993;100:633-642.
  103. **Kodaira M, Hanai H, Kajimura M, Futami H, Maruyama Y, Sato Y, Arai H, Kaneko E.** Further evidence that exacerbation of ulcerative colitis causes the onset of immune thrombocytopenic: a clinical case. *Am J Gastroenterol* 1999;94: 1408-1410.
  104. **Macey MG, Newland AC.** CD4 and CD8 subpopulation changes during high dose intravenous immunoglobulin treatment. *Br J Haematol* 1990;76: 513-520.
  105. **Liszewsky K.** The complement system. In: *Fundamental Immunology*, Third edition (Paul WE ed) 1993 pp34 Raven Press, New York.
  106. **Engelfrieth CP, Reesink HW.** The treatment of patients with autoimmune thrombocytopenia with WIG anti-D. *Vox Sanguinis* 1999;76:250-255.
  107. **Hohan-Kessary HS, Gershon H.** Isoantibodies in immunoglobulin for intravenous treatment may cause erythrocyte sequestration. *Vox Sanguinis* 1999;77:33-39.
  108. **Turner CE, Thorpe SJ, Brasher MDR, Thorpe IL, Ami RH D.** activity of commercial intravenous immunoglobulin preparations. *Vox Sanguinis* 1999;76: 55-58.
  109. **Jendreyko N, Uttenreuther-Fischer MM, Lerch II, Gaidicke G, Fischer P.** Genetic origin of IgG anti-antibodies cloned by phage display and anti-idiotypic pairing from three patients with autoimmune thrombocytopenia. *Eur J Immunol* 1998;28:4236-4237.
  110. **Ericson SG, Coleman KD, Wardwell K, Baker S, Fanger MW, Guyre PM, Ely P.** Monoclonal antibody 197 (anti-Fc gamma RI) infusion in a patient with immune thrombocytopenia purpura (ITP) results in down-modulation of Fc gamma RI on circulating monocytes. *Br J Haematol* 1996;92:718-724.
  111. **Soubrane C, Tourani JM, Andrieu JM, Visonneau S, Beldjord K, Israel-Biet D, Mouawad IL, Bussel J, Weil M, Khayat D.** Biologic response to anti-CD 16 monoclonal antibody therapy in a human immunodeficiency virus-related immune thrombocytopenic purpura patient. *Blood* 1993;81:15-19.
  112. **Zauli G, Re MC, Gugliotta L, Visani G, Vianelli N, Furlini G, La Placa M.** Lack of compensatory megakaryocytopoiesis in HIV-1 -seropositive thrombocytopenic purpura patients. *AIDS* 1991; 5:1345-1350.
  113. **Jshji H, Oh H, Uchida Y, Nakamura H, Endo N, Asai T, Yoshida S.** Effect of interferon (IFN) on refractory idiopathic thrombocytopenic purpura: administration of a 6 million units of recombinant IFN alpha-2b. *Intern Med* 1992; 31:1343-1347.
  114. **Stelilini R, Rossi G, Paroninfo G.** Interferon therapy in intravenous users with HIV-associated idiopathic thrombocytopenic purpura. *Haematologica* 1992;77:418-420.
  115. **Kumakura S, Ishikura H, Tsumura H, Endo J, Tsunematsu T.** A favourable effect of long-term alpha-interferon therapy in refractory idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1993;85:805-807.
  116. **Cohn RJ, Schwyzer IL, Hesseling PB, Poole JE, Naidoo J, van Heerden C.** Alpha-Interferon therapy for severe chronic idiopathic thrombocytopenic purpura in children. *Am J Hematol* 1993;43:246-250.
  117. **Vianelli N, Catani L, Gugliotta L, Belmonte MM, Cascione L, Colangeli V, Ricchi E, Mazza P, Mazzucconi MG, Chistolini A.** Recombinant alpha-interferon 2b in the treatment of HW-related thrombocytopenia. *ADS* 1993;7:823-827.

118. **Fabris F, Sgarabotto D, Zanon E, Francavilla F, Zaggia F, Cadrobbi P, Girolami A.** The effect of a single course of alpha-2B-interferon in patients with HIV-related and chronic idiopathic immune thrombocytopenia. *Autoimmunity* 1993;14:175-179.
119. **Dubbeld P, Hillen HF, Schouten HC.** Interferon treatment of refractory idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 1994;52:233-235.
120. **Northfelt DW, Kaplan LD, Abrams DI.** Continuous, low-dose therapy with interferon alpha for human immunodeficiency virus (HIV)-related immune thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 1991;38:238-239.
121. **Fujimura K, Takafuta T, Kuriya S, Abe T, Akatsuka J, Yasunaga K, Uchida T, Kawakita M, Kitamura K, Nomura T, Kuramoto A.** Recombinant human interferon alpha2b (rIFN alpha-2b) therapy. *Am J Hematol* 1996;51:37-44.
122. **Vianelli N, Tazzari PL, Baravelli, Ricci F, Valdre L, Tura S.** Interferon-alpha 2b is not effective in the treatment of refractory immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica* 1998;83:761-763.
123. **Shrestha R, Mckinley C, Buir B.M, Everson GT.** Possible idiopathic thrombocytopenic purpura associated with natural alpha interferon therapy for chronic hepatitis C infection. *Am JGastroenterol* 1995;90:1146-1147.

## APÉNDICE MARCO TEÓRICO

---

Para conocer la forma en que la integrina beta 3 recibe y envía las señales de activación al interior de la plaqueta (*outside in signaling*), y la forma en que recibe las señales de activación del interior de la misma (*inside out signaling*), se realizó la revisión de la bioquímica y fisiología plaquetaria. Fue necesario conocer el por qué el hecho de tener cuentas sanguíneas disminuidas de plaquetas dan como resultado signos hemorrágicos. La integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  fue la primera en estudiarse a detalle, por su presencia en la membrana plaquetaria para realizar las principales funciones de adhesión y agregación que realiza la plaqueta en la formación del coágulo sanguíneo.

En este artículo se revisa a detalle la producción, morfología y los mecanismos de activación plaquetaria.

### 2. PLAQUETAS

**Domínguez V** y Ambriz R. Bioquímica y fisiología plaquetaria. *Revista de Hematología*. 2001(a); 2: 117-127. Artículo de revisión

## Bioquímica y Fisiología Plaquetaria

<sup>1,2</sup>Ma. Victoria Domínguez García, <sup>2</sup>Raúl Ambríz Fernández

### Resumen

En 1874 y 1878 fueron descritas las plaquetas por William Oster y Georges Hayem respectivamente, pero el término plaqueta lo usó por primera vez Julius Bizzozzero.

Las plaquetas provienen del citoplasma de los megacariocitos maduros de la médula ósea. Estas células tienen poliploidía de 8C hasta 128C. No hay evidencia directa de que la poliploidía esté relacionada con la cantidad, tamaño y funcionamiento de las plaquetas.

Las plaquetas viven en circulación alrededor de 10 días y miden de 1.5 a 2.5  $\mu$ m de diámetro. Participan activamente en el proceso de la hemostasia, en la regulación del tono vascular, la fibrinólisis y la reparación de heridas, pero también facilitan las metástasis tumorales. Circulan en el árbol vascular en forma pasiva, pero en respuesta a daño endotelial sufren activación y empiezan los procesos de adhesión, cambio de forma, agregación y secreción, lo que da lugar a la formación del tapón hemostático.

Podemos decir que los trombos plaquetarios son "buenos" cuando cesan una hemorragia y "malos" cuando sin ruptura del vaso sanguíneo el trombo obstruye la circulación sanguínea, razón por la cual es muy importante conocer la fisiología plaquetaria para poder intervenir en las reacciones críticas de la formación de estos trombos plaquetarios.

**Palabras clave:** plaquetas, agregantes, antiagregantes.

### Historia

Las plaquetas fueron descritas por William Oster en 1874 y por Georges Hayem en 1878 (1). El término de plaqueta fue usado por primera vez por Julius Bizzozzero quien además describió el cambio de forma de las plaquetas y su participación en la hemostasis.<sup>1</sup>

Desde el año 1906 se sabe que las plaquetas son fragmentos celulares producto de la desintegración del citoplasma de los megacariocitos.<sup>2,3</sup> Pero el mecanismo por el cual ocurre esta desintegración permanece sin resolver.<sup>4</sup>

### Producción y liberación de las plaquetas

Las plaquetas provienen de los megacariocitos de la médula ósea, células terminales que ya no se pueden dividir, los cuales derivan de células progenitoras proliferantes. La regulación de la megacariocitopoyesis es un proceso biológico muy complejo que empieza con las células tallo hematopoyéticas.<sup>4-7</sup> La trombocitopoyesis está regulada por una red complicada de interacciones entre diferentes células tallo, células del estroma de la médula ósea, factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular, así como muchas citocinas: IL- 1, IL- 3, 11-6, IL- 11, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina y la más importante de todas la trombopoyetina, lo cual da por resultado la producción de alrededor de  $2 \times 10^{11}$  plaquetas por día.<sup>5, 8-16</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F.  
<sup>2</sup>Banco Central de Sangre, Centro Médico Nacional SXXI IMSS México, D.F.

**Correspondencia:** Ma. Victoria Domínguez. Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510.

0Tel: 56-22-38-54 Fax 56-22-33-69

Correo electrónico: mavi@biomedicas.unam.mx

La trombocitopoyesis se entiende mejor si se conocen sus células precursoras, estas células precursoras pueden clasificarse en tres estados: células progenitoras, megacariocitos inmaduros (promegacarioblastos) y megacariocitos maduros. Las células progenitoras proliferan en la presencia de un gran número de señales mitóticas.

Los promegacarioblastos constituyen el 5% del total de megacariocitos. En los humanos estas células tienen la talla y la morfología de un linfocito y ya expresan en su membrana gp11b (CD41) y factor von Willebrand, así como factor 4 plaquetario en su citoplasma. En esta etapa de maduración es posible identificar una enzima que también se expresa en el retículo endoplásmico de las plaquetas, esta enzima es una peroxidasa que interviene en la síntesis de prostaglandinas.<sup>17-20</sup>

Los promegacarioblastos expresan CD34 pero precisamente estas células son transicionales ya que van reduciendo la expresión de CD34 conforme va aumentando la expresión de gp11b-IIIa (CD41/CD61).<sup>19-</sup>

<sup>24</sup> Los promegacarioblastos o megacariocitos inmaduros también tienen la capacidad de proliferar, pero a medida que pasan al siguiente estadio de megacariocitos maduros pierden la capacidad de proliferar. Estas células tienen una gran respuesta a la demanda de plaquetas, si se produce trombocitopenia aumentan y si por el contrario existe trombocitosis disminuyen, estas disminuciones o aumentos se reflejan en la disminución o aumento de los megacariocitos maduros.<sup>25</sup> Los megacariocitos maduros ya no proliferan pero siguen teniendo endomitosis, lo que se refleja en la poliploidía de estas células. En los megacariocitos maduros se pueden distinguir cuatro estados. El primero es el megacarioblasto que tiene una razón núcleo/citoplasma muy grande con un citoplasma escaso y muy basófilo debido a la síntesis proteica tan activa en esta etapa. El segundo es el promegacariocito o megacariocito basófilo en el que se observa aumento del volumen del citoplasma y del núcleo así como la aparición de gránulos azurófilos. El tercero es el megacariocito granular con un gran núcleo multilobulado y citoplasma acidófilo con gran cantidad de gránulos azurófilos. Finalmente los megacariocitos maduros que son células muy grandes, granulares y productoras de plaquetas con un gran citoplasma y un gran núcleo picnótico y lobulado por las endomitosis que se llevaron a cabo.<sup>25</sup>

La poliploidía del núcleo de los megacariocitos va desde 8C hasta 128C, siendo 16C el valor que más se repite (2C es el contenido normal de ADN de una célula somática). La síntesis de ADN ocurre principalmente en el estadio de promegacarioblastos y todavía en el 20 al 40% de los megacarioblastos.<sup>26,27</sup> No hay evidencia

directa de que la poliploidía de los megacariocitos esté relacionada con la cantidad, tamaño y funcionamiento de las plaquetas.<sup>28,29</sup>

Se estima que un megacariocito puede producir de 1,000 a 5,000 plaquetas. Si se aumenta la demanda de plaquetas, lo que se aumenta es la cantidad de megacariocitos y no la producción de plaquetas por megacariocito; se calcula que la producción se puede incrementar hasta en 8 veces. El mecanismo exacto de la fragmentación del citoplasma de los megacariocitos para la formación de las plaquetas no se conoce, pero puede estar implicado el citoesqueleto. En la enfermedad de Bernard-Soulier (las plaquetas no tienen el complejo Ib-IX en la membrana, complejo que se une al citoesqueleto a través de la proteína que une actina) las plaquetas son gigantes y no funcionales.<sup>30-32</sup> Y en las ratas wistar-furth también existen plaquetas gigantes debido a la ausencia de talina del citoesqueleto.<sup>33,35</sup>

### Vida media y distribución

En los humanos las plaquetas tienen una vida media de 10 días. En condiciones normales las plaquetas son retiradas de la circulación por envejecimiento y solo algunas de ellas son retiradas al azar de manera no específica.<sup>36-39</sup>

Del total de plaquetas producidas, un tercio es retenido transitoriamente en el bazo y después pasan a la circulación. La epinefrina libera a las plaquetas del secuestro esplénico. Un bazo congestivo puede retener hasta el 90% de la producción de plaquetas, produciendo un estado de trombocitopenia.<sup>40-42</sup>

### Morfología y bioquímica

Las plaquetas son fragmentos celulares con una gran capacidad para adherirse a los vasos sanguíneos dañados, se agregan unas a otras y participan activamente en el proceso de la hemostasia. Cuando el vaso sanguíneo sufre una ruptura el tapón hemostático impedirá la salida de la sangre; pero cuando el vaso sanguíneo está intacto y por algún motivo es capaz de fijar plaquetas y activarlas entonces el trombo hemostático impedirá el flujo sanguíneo normal. Además de la participación en la hemostasis participan en la regulación del tono vascular, la fibrinólisis y la reparación de heridas, pero también facilitan las metástasis tumorales.<sup>43</sup>

En un extendido de sangre periférica teñido con colorante de Wright se observa a las plaquetas en forma de cuerpos ovalados o redondos de color azul grisáceo con gránulos rojizos. El diámetro varía entre 1.5 a 2.5 mm en condiciones normales aunque también pudieran

observarse plaquetas un poco más grandes sin que esto signifique alguna patología. Se conoce que las plaquetas que acaban de salir a la circulación (plaquetas jóvenes) son de mayor tamaño que las plaquetas que están finalizando su vida media (plaquetas viejas). Existen patologías en las que se observan plaquetas gigantes como en la enfermedad de Bernard-Soulier, en deficiencia de vitamina B12 y en la púrpura trombocitopénica autoinmune.<sup>43-45</sup>

#### a) Glicocalix

Usando microscopía electrónica se puede observar la capa que envuelve a la membrana celular o glicocalix (14-20 nm de extensión). Esta capa está constituida por glicoproteínas, glicolípidos mucopolisacáridos y proteínas absorbidas del plasma. Las glicoproteínas y glicolípidos son ricos en ácido siálico lo que le da una carga neta negativa a la plaqueta. Más adelante se revisarán en detalle las glicoproteínas de este glicocalix que participan en la hemostasis.<sup>43</sup>

#### b) Membrana citoplasmática

Después del glicocalix se encuentra la membrana citoplasmática, que como todas las membranas es una unidad trilaminar compuesta por una bicapa de fosfolípidos en la que se encuentran embebidos colesterol, glucolípidos y glucoproteínas así como las bombas de sodio y potasio que controlan el medio ambiente iónico. Los fosfolípidos de la membrana se exponen, en forma de micropartículas, como resultado del cambio de forma cuando ocurre la activación plaquetaria. La membrana está constituida por 57% de proteínas, 35% de lípidos y 8% de carbohidratos. De los lípidos el 75% son fosfolípidos, el 20% son lípidos neutros (de los cuales el 95% es colesterol) y el 5% glicolípidos. La proporción de fosfolípidos es la siguiente: 38% de fosfatidilcolina, el 27% de fosfatidiletanolamina, el 17% de esfingomielina, el 10% de fosfatidilserina y el 5% de fosfatidilinositol. Entre los ácidos grasos que forman los fosfolípidos se encuentra el ácido araquidónico en una proporción de alrededor del 35%.<sup>43, 45, 47</sup>

#### c) Sistemas de membrana

La membrana de la plaqueta es una membrana enorme en longitud si se piensa que se prolonga dentro de toda la plaqueta en lo que se llama sistema canalicular abierto. La principal función de este sistema es permitir la liberación del contenido de los gránulos, así como la incorporación de elementos del plasma al interior de la célula. Cuando la plaqueta se activa, se forman proyecciones de la membrana en forma de pseudópodos y precisamente lo hace a expensas de esta membrana contenida en el sistema canalicular abierto. También se conoce que las glucoproteínas de la membrana se

encuentran en mayor cantidad en las plaquetas activadas, y precisamente estas proteínas provienen del sistema canalicular abierto (gplb.1X) y de los gránulos  $\alpha$  (gpllb-IIIa).

Otro sistema de membrana es el sistema tubular denso, que es una red de canales cerrados de retículo endoplásmico residual que se caracteriza por una elevada actividad peroxidasa. En este sistema se secuestran iones de calcio así como nucleótidos (ATP, ADP) y serotonina que se liberan rápidamente al ocurrir la activación plaquetaria. También en este sitio es donde se realiza la mayor cantidad de síntesis de prostaglandinas, de hecho, la peroxidasa es una enzima que interviene en esta síntesis.<sup>43, 46, 48-50</sup>

#### d) Citoesqueleto

El citoesqueleto está formado por filamentos de actina que se localizan por debajo de la membrana plasmática, así como vimentina, proteína que une actina, talina, miosina, vinculina y espectrina. Todas estas son proteínas contráctiles que permiten la conservación en forma de disco ovalado cuando la plaqueta se encuentra en circulación pero en reposo, así como el cambio de forma tan drástico cuando se activa. De hecho, las glicoproteínas de membrana que actúan como receptores de activación tienen en sus regiones citoplasmáticas sitios de unión con las proteínas del citoesqueleto para enviar las señales de activación del exterior de las plaquetas hacia el interior. Aquí en el citoesqueleto también se encuentran las proteínas que regulan la transducción de las señales de activación como son: cinasas de tirosina de la familia src (src, yes, fyn, hck y lyn), la cinasa de adhesión focal (FAK), la calmodulina y la proteína activante de GTPasa y varias isoenzimas de la proteína cinasa C (PKC), así como las fosfatasa y la fosfolipasa A (PLA).<sup>44, 51-53</sup>

#### e) Microtúbulos

Inmediatamente, también por debajo de la membrana plasmática, se encuentra una banda de microtúbulos. Están compuestos de polímeros de subunidades de las proteínas  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina de 55 kDa. de peso molecular.<sup>44</sup>

#### f) Microfilamentos

La proteína contráctil actina se polimeriza en microfilamentos, que cuando la plaqueta está en reposo, no son tan evidentes, pero una vez que la plaqueta se ha activado, y ocurre la formación de filópodos, entonces se pueden observar estos microtúbulos de actina polimerizados con otras proteínas.<sup>44</sup>

#### g) Organelos

La zona de organelos está compuesta por peroxisomas, pequeños organelos ricos en enzima



catalasa. También se encuentran alrededor de siete mitocondrias y lisosomas conteniendo hidrolasas ácidas, típicas de estos organelos. Los gránulos densos, llamados así porque en microscopía electrónica aparecen precisamente como cuerpos densos, son ricos en  $Ca^{++}$ , serotonina, ADP y ATP.

Los principales organelos por ser los más abundantes (50 a 80 por plaqueta) son los gránulos  $\alpha$ . Además son muy importantes por su contenido de  $\beta$ -tromboglobulina, factor 4 plaquetario, factor von Willebrand, fibrinógeno, fibronectina, trombospondina, vitronectina, factor V, proteína S, factor XI, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento transformante  $\beta$ , factor de crecimiento de células endoteliales, factor de crecimiento epidermal,  $\alpha 2$ -antiplasmina, inhibidor del activador del plasminógeno, albúmina, inmunoglobulinas, P-selectina (CD62P), GW 33, osteonectina, etc. Al parecer algunas de estas proteínas las toma la plaqueta del plasma, ya que ella no tiene la capacidad de síntesis.<sup>44, 54, 55</sup>

### Glucoproteínas de la membrana plaquetaria

Las plaquetas también son conocidas con el nombre de trombocitos por el papel que tienen en la formación del trombo hemostático. La participación de la plaqueta en la formación del coágulo es muy importante. Mediante sus receptores de membrana (complejos glucoproteicos), de los cuales los más importantes son los complejos  $g_{pIIb-IIIa}$  y  $g_{pIb-IX}$ , se adhiere a los endotelios dañados a través de proteínas plasmáticas como el fibrinógeno, factor von Willebrand y fibronectina, entre otras. Posteriormente y como consecuencia de la activación de estos receptores ocurren cambios bioquímicos en el citoplasma plaquetario. Estos cambios incluyen fosforilación en tirosina de varias cinasas como src, fyn y fak; lo que conduce a la activación de fosfolipasa C (PLC), formación de trifosfato de inositol, diacilglicerol, flujo de  $Ca^{++}$  y fosforilación de proteínas contráctiles dependientes de ATP. Todos estos eventos se expresan en un cambio en la forma y estructura de las plaquetas dando lugar a la formación de grandes agregados plaquetarios. Se secretan sustancias vasoactivas (serotonina) y agregantes (tromboxano A2 y nucleótidos como el ATP y el ADP) entre otras, lo que finalmente permite el reclutamiento y activación de mayor número de plaquetas.<sup>56-67</sup>

Además de los cambios de forma ocurre la exposición de fosfolípidos de la membrana plaquetaria que actúan como parte de los complejos enzimáticos de la coagulación. Estos complejos son: a) el diezasa que está formado por el factor IX,  $Ca^{++}$  y fosfolípidos plaquetarios y tiene como cofactor al factor VIII (a este complejo antes se le llamaba la diezasa de la vía intrínseca); b) el otro

complejo diezasa que está formado por el factor VII,  $Ca^{++}$  y fosfolípidos de la membrana plaquetaria y tiene como cofactor al factor tisular (a este complejo antes se le llamaba la diezasa de la vía extrínseca) y c) el complejo protrombinasa que está formado por el factor X,  $Ca^{++}$  y fosfolípidos de la membrana plaquetaria y tiene como cofactor al factor V. Complejos que intervienen en la formación de trombina. Como puede observarse el hecho de que los complejos enzimáticos se formen en la membrana de las plaquetas asegura que la coagulación ocurra precisamente en un sitio localizado. La trombina actúa sobre el fibrinógeno (que justamente se encuentra ya unido a las plaquetas en el receptor  $g_{pIIb-IIIa}$ ) para formar la fibrina. De esta forma la fibrina se deposita sobre los agregados plaquetarios. Posteriormente las mismas plaquetas realizan la retracción del coágulo para darle mayor firmeza.<sup>68, 69</sup>

Como se ha mencionado los receptores de la plaqueta juegan un papel muy importante en la activación plaquetaria, ya que además de recibir las señales de activación del exterior y enviarlas hacia el interior de la célula, también envían el mensaje de activación celular del interior hacia el exterior, modificando los dominios extracelulares de reconocimiento del ligando o aumentando en la superficie la cantidad de receptores.<sup>69</sup>

Los receptores son glucoproteínas cuya síntesis se lleva a cabo en los megacariocitos. Cuando la plaqueta sale a circulación sanguínea, proveniente de la médula ósea ya lleva en su membrana y en los gránulos  $\alpha$ , o en el sistema canalicular abierto la cantidad de receptores que necesita. Cuando la plaqueta está en reposo expresa un cierto número de receptores, pero cuando se activa se expresa en la superficie de los receptores que se encontraban "almacenados".<sup>69</sup>

Las plaquetas realizan interacciones, a través de sus glucoproteínas de membrana con proteínas de su medio ambiente, con células endoteliales y también con otras plaquetas. Estas glicoproteínas pertenecen a diferentes familias de receptores. Se mencionarán en el texto de acuerdo a la importancia de su participación en la hemostasis.

#### a) Glucoproteínas ricas en leucina

Estas glucoproteínas tienen en común unidades ricas en leucinas. La unidad rica en leucinas tiene una secuencia consenso de 24 aminoácidos con 7 leucinas espaciadas regularmente, lo que les da una estructura característica de lámina  $\beta$ -hélice  $\alpha$ . Pertenecen a esta familia las glucoproteínas del complejo  $Ib-IX$  y  $gpV$ .

El complejo  $Ib-IX$  está presente en aproximadamente 25 000 copias en la membrana plaquetaria. Está formado por las subunidades  $Ib$  y  $IX$ . La subunidad  $Ib$  a su vez

consta de dos cadenas polipeptídicas unidas por un puente disulfuro, llamadas gplb $\alpha$  y gplb $\beta$  de 143 y 22 kDa de peso molecular respectivamente. Cada una de estas subunidades tiene su región transmembranal. Ambas proteínas tienen tanto N-glicosilación como O-glicosilación con hexasacáridos ricos en ácido siálico. La gplb $\alpha$  es degradada por una proteasa plaquetaria endógena para producir un fragmento llamado glicocalicina de 140 kDa con 40-60% de carbohidratos en peso. Tiene un dominio extracitoplasmático con 7 unidades ricas en leucina. El tallo citoplasmático interactúa con la proteína que une actina, para unirse al citoesqueleto.

La gplb $\beta$  tiene un sitio de fosforilación en serina en su porción citoplasmática y una unidad rica en leucina en el dominio extracitoplasmático.

La subunidad IX es una glicoproteína de 17 kDa de peso molecular. Tiene un tallo citoplasmático muy corto y en su dominio extracitoplasmático tiene una unidad rica en leucina. No se conoce exactamente cual es la función de gpIX.

El complejo gplb-IX funciona como receptor del factor von Willebrand. Este factor posee un dominio de unión con gplb-IX diferente a la secuencia RGD que interactúa con gpIIb-IIIa.

*In vitro* la gplb reacciona con el factor *von Willebrand* sólo si se agrega el antibiótico ristocetina o el veneno de víbora botrocetina. El mecanismo de esta interacción involucra un cambio de carga en la molécula de gplb. No es necesaria la activación plaquetaria para que gplb-IX una a su ligando. También la gplb es capaz de unir trombina en una reacción de alta afinidad, incluso se le conoce como el receptor de alta afinidad de la trombina.<sup>69,70</sup>

GpV es una glucoproteína de 82 000 kDa de peso molecular. Tiene 15 unidades ricas en leucina. Se piensa que forma parte del complejo gplb-IX pero de acuerdo a la cantidad de receptores expresados en la membrana plaquetaria, parece ser que el complejo consiste de dos moléculas de gplb-IX por una molécula de gpV.<sup>69,71</sup>

## b) Integrinas

Las integrinas son receptores que interactúan con proteínas de la matriz extracelular o con otras células para realizar procesos biológicos de gran importancia como el desarrollo embrionario, reparación de heridas, apoptosis, hemostasis, crecimiento tumoral y metástasis, «homing» y activación de leucocitos y el mantenimiento de la integridad vascular.

Estos receptores son heterodímeros formados por una cadena polipeptídica  $\alpha$  y una cadena polipeptídica  $\beta$ , unidas en forma no covalente. A la fecha se han identificado 16 cadenas  $\alpha$  y 8 cadenas  $\beta$ . La combinación de una de las diferentes cadenas  $\alpha$  con una de las diferentes cadenas  $\beta$  da lugar a la formación de más de 20 receptores.<sup>72</sup>

Cuando las integrinas unen a sus ligandos se forman agregados de estos receptores en lo que se llama adhesiones focales. Estos agregados se unen con complejos proteicos intracelulares del citoesqueleto (talina, vinculina,  $\alpha$ -actinina), para después unir filamentos de actina, lo que finalmente termina en activación celular. Esta función está regulada por fosforilación en serina, treonina y tirosina de la cadena  $\beta$ .<sup>73-75</sup>

Las plaquetas expresan en su membrana por lo menos 5 miembros de la familia de las integrinas.

### GpIIb-IIIa (receptor de fibrinógeno) ( $\alpha$ IIb- $\beta$ 3) (CD41/CD61)

Este complejo está presente en aproximadamente 40 000-80 000 copias en la membrana plaquetaria. También se expresa en la membrana de los megacariocitos y en las células endoteliales. Pertenece a la familia  $\beta$ 3 de las integrinas; siendo la primer integrina que se caracterizó.

Es un heterodímero  $Ca^{++}$  dependiente. Está formado por dos subunidades: gpIIb y gpIIIa. La subunidad IIb a su vez está formada por dos cadenas de 116 y 15 kDa de peso molecular unidas por un enlace disulfuro. Sólo la cadena ligera tiene región transmembranal. La cadena pesada, por lo tanto, es solamente extracitoplasmática y tiene 4 sitios que unen  $Ca^{++}$ . Este ión es muy importante para darle estructura al complejo receptor completo. La cadena ligera tiene un sitio de N-glicosilación y la cadena pesada tiene cuatro.

La subunidad IIIa es una sola cadena polipeptídica de 110 kDa de peso molecular, con 6 sitios de N-glicosilación. Tiene un dominio extracitoplasmático, un dominio transmembranal y un dominio intracitoplasmático. El dominio extracitoplasmático tiene una región rica en cisteínas, que forman numerosos puentes disulfuro, característica de todas las 8 cadenas  $\beta$  de la familia de las integrinas.

El complejo IIbIIIa es el receptor de fibrinógeno, pero además une fibronectina, vitronectina, trombospondina y factor von Willebrand. Sólo después de activarse con

trombina, colágena o ADP es capaz de unirse a su ligando. Es decir las plaquetas en reposo necesitan dos señales de activación para desencadenar toda la serie de eventos bioquímicos necesarios para la activación a través de este receptor, a diferencia del complejo Ib-IX que requiere únicamente una señal de activación. Todos sus ligandos tienen una secuencia de aminoácidos RGD (arg-gli-asp) que es reconocida por el receptor. El fibrinógeno además tiene la secuencia HHLGGAKQAGDV en la cadena  $\gamma$  que también es reconocida por el receptor.<sup>69, 76-78</sup>

#### **$\alpha V\beta 3$ (receptor de vitronectina) (CD 51/CD 61)**

Junto con el receptor anterior forman los dos miembros de la familia de las integrinas con cadena  $\beta 3$ . A pesar de que comparte la misma cadena  $\beta 3$ , y que la cadena  $\alpha V$  tiene 36% de homología en la secuencia de aminoácidos con la cadena  $\alpha IIb$ , este receptor difiere en muchos sentidos del receptor  $gPIIb-IIIa$  ya que su densidad en las plaquetas es de solamente 50 a 100 receptores por plaqueta; además de que no fija iones de calcio sino de magnesio o de manganeso. A pesar de estas diferencias los ligandos son los mismos que para  $gPIIb-IIIa$ .

Este receptor también se expresa en la membrana de las células endoteliales, osteoclastos y en muchos otros tipos celulares.<sup>79</sup>

#### **$GPIa-IIa$ (receptor de colágena) (VLA-2) ( $\alpha 2\beta 1$ ) (CD49b/CD29) (ECMR)**

Este receptor pertenece a la familia  $\beta 1$  de las integrinas. La subunidad  $\alpha 2$  contiene la región homóloga de las cadenas  $\alpha$ , la región que une iones divalentes, en este caso une iones de magnesio o de manganeso. Actúa como receptor de colágena en las plaquetas y en los fibroblastos, y como receptor de colágena y laminina en las células endoteliales. Además se encuentra en otros tipos celulares.<sup>69, 78</sup>

#### **$GPIc^*-IIa$ (receptor de fibronectina) (VLA-5) ( $\alpha 5\beta 1$ ) (CD49e/CD29)**

Este receptor también pertenece a la familia  $\beta 1$  de las integrinas. Tampoco es un receptor exclusivo de plaquetas, ya que se encuentra en diferentes tipos celulares, en donde participa en el desarrollo celular y en la formación de metástasis. Funciona como receptor de fibronectina, aún en las plaquetas en reposo a diferencia de  $gPII-IIIa$  que también une fibronectina pero en plaquetas previamente activadas.<sup>69</sup>

#### **$GPIc-IIa$ (receptor de laminina) (VLA-6) ( $\alpha 6\beta 1$ ) (CD49f/CD29)**

Al igual que los dos receptores anteriores, éste también pertenece a la familia  $\beta 1$  de las integrinas y también tiene

una amplia distribución celular. Fija iones de magnesio o de manganeso y no es necesaria la activación plaquetaria para que fije a su ligando.<sup>69</sup>

#### **c) Receptor de 7 dominios transmembranales**

Este receptor pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G. Está formado por una cadena polipeptídica con 7 dominios transmembranales. La región N-terminal extracelular contiene un sitio donde la trombina rompe un enlace peptídico, entre arg41 y ser42. El péptido desde ser42 hasta fen55 (sin separarse de la cadena polipeptídica) es el responsable de la activación y por lo tanto de la agregación plaquetaria inducida por este receptor. Péptidos sintéticos de esta región, como por ejemplo el péptido SFLLRN, son capaces de activar al receptor en ausencia de trombina. No se conoce si el péptido N-terminal hasta arg41 que se libera de la superficie plaquetaria tiene alguna función.<sup>79</sup>

Existen de 1,500 a 2,000 copias de este receptor en la membrana plaquetaria. Como se mencionó es un receptor de trombina pero funciona como un receptor de baja afinidad (comparada con la afinidad de  $gPIb-IX$ ). Además de la trombina, se han identificado a otras enzimas que son capaces de activar, aunque en forma más débil, a este receptor. Estas enzimas son tripsina, granzima A, plasmina, catepsina G y elastasa.<sup>80, 81</sup>

#### **d) Selectinas**

Esta familia de glucoproteínas tiene un dominio de lectina, dependiente de iones calcio, que reconocen ligandos constituidos por carbohidratos. Son básicamente tres tipos de selectinas, que se denominan de acuerdo a la célula en la cual se identificaron por primera vez. De esta forma hay L-selectina (linfocitos), E-selectina (células endoteliales) y P-selectina (plaquetas). De estas glicoproteínas, la P-selectina (OMPI40) (PADGEM) (CD62P) es la que se encuentra en la membrana de los gránulos a de las plaquetas en reposo, pero una vez que las plaquetas han sido activadas las p-selectinas se mueven a la membrana plaquetaria. Además se encuentran también en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales. El papel exacto de la P-selectina en la formación del coágulo hemostático no está muy claro, pero, en procesos trombóticos que consumen plaquetas se encuentran niveles plasmáticos elevados. En ratones «knockout» de p-selectina se observó que además de que los leucocitos no podían rolar sobre el endotelio, tampoco podían hacerlo las plaquetas, lo que resultó en alargamiento de los tiempos de sangrado.<sup>82</sup>

## Mecanismos de activación plaquetaria

Las plaquetas circulan en el árbol vascular en forma pasiva, pero en respuesta a daño endotelial sufren activación y empiezan los procesos de adhesión, cambio de forma, agregación y secreción lo que da lugar a la formación del tapón hemostático. La activación empieza cuando los receptores unen a sus ligandos.

La adhesión es el primer paso en la activación plaquetaria, para que se realice se necesita de la interacción entre los receptores de la membrana plaquetaria y las proteínas adhesivas de la matriz extracelular de las células endoteliales o de las proteínas adhesivas del plasma. Entonces los participantes de la adhesión deben estar lo suficientemente cerca para que se realice la unión. Como puede advertirse factores como la cantidad de plaquetas, número de receptores por plaqueta, afinidad de los receptores, concentración de los ligandos, velocidad del flujo sanguíneo, calibre del vaso sanguíneo dañado y tamaño de la lesión son importantes para que se realice dicha interacción.<sup>83,84</sup> Parece ser que a velocidades de flujo altas el receptor que funciona bien es el receptor gplb-IX que se adhiere bien al factor von Willebrand. Es decir, altas velocidades de flujo ocurren en las arterias, por eso los agregados plaquetarios de las arterias son más frecuentes que en las venas donde predominan más los coágulos de fibrina. También el receptor de colágena (gpla-IIa) (VLA-2) juega un papel muy importante en este primer paso de adhesión, ya que la colágena se expone cuando el endotelio sufre una ruptura.<sup>44,85,86</sup> No se sabe el papel exacto de los otros receptores, como el receptor de laminina (gplc-IIa) (VLA-6), el receptor de fibronectina (gplc\*-IIa) (VLA-5) y el receptor de vitronectina ( $\alpha$ V $\beta$ 3) en las reacciones de adhesión, pero una vez que un receptor ha unido a un ligando es más fácil que otros receptores encuentren también a sus ligandos reforzando así la adhesión.<sup>87-89</sup>

Con la adhesión se logró activar a la plaqueta, en seguida ocurrió la agregación plaquetaria, donde empiezan a ocurrir los cambios de forma de la plaqueta.<sup>90</sup> Para que esta reacción se lleve a cabo ocurren una serie de reacciones en el citoplasma de la plaqueta. Por una parte hay activación de la fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC) que hidroliza al 4,5 difosfato de inositol (PIP2) en 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3) y 1,2-diacilglicerol (DG). Por otra parte, la adenilato ciclasa convierte el ATP en AMPc. Estos productos llamados segundos mensajeros activan protein-cinasas. El IP3 libera Ca<sup>++</sup>, el cual es fijado por la calmodulina que activa otras cinasas dependientes de calmodulina y Ca<sup>++</sup>. El DG activa a la protein cinasa C (PKC), y el AMPc activa a las cinasas dependientes de AMPc. Todas estas cinasas actúan fosforilando a otras proteínas.<sup>91-93</sup> El papel de la gpIIb-IIIa es muy importante

en la iniciación de todas las cascadas de fosforilación de las proteínas, ya que si se inhibe la reacción con sus ligandos con el péptido RGDS que es la secuencia que reconoce esta integrina en sus ligandos no se observa la fosforilación. Ocurre lo mismo en las plaquetas deficientes de este complejo (la enfermedad en la que no hay gpIIb-IIIa en las plaquetas se conoce con el nombre de Tromboastenia de Glanzmann).<sup>94,95</sup>

Existen diferentes agonistas, entre ellos la trombina, capaces de estimular a gpIIb-IIIa pero en ausencia de fibrinógeno ninguna reacción de fosforilación ocurre, pero además se necesita que haya agregación plaquetaria para que se observe la fosforilación en tirosina de proteínas de 84, 95 y 97 kDa de peso molecular.<sup>96</sup>

Las protein-cinasas de la familia src que se asocian con la proteína GAP son las proteínas pp60c-src, pp62c-yes, pp59fyn, hck y lyn. La pp60c-src y pp59fyn interactúan con la PLC y cinasas de fosfatidilinositol y diacilglicerol cuando las plaquetas se han estimulado con trombina, y se asocia también con las proteínas del citoesqueleto. De hecho cuando las protein-cinasas están asociadas al citoesqueleto son más activas que cuando se encuentran en forma soluble.<sup>97,98</sup>

Clark elaboró un modelo en el que explica la fosforilación de proteínas en tres distintas etapas que se pueden distinguir experimentalmente. Primero ocurre la fosforilación «temprana» de proteínas como p21 ras GAP (proteína activante GTP-asa) y cinasas de tirosina de la familia src, esta primera onda de fosforilación sólo requiere de la activación de integrinas con agonistas como trombina, colágena o ADP y no se necesita la unión de fibrinógeno, después cuando se une el fibrinógeno se inicia la segunda onda de fosforilación en tirosina de proteínas como p140 y otras de 50 a 68 kDa de peso molecular; y finalmente ocurre la tercera onda de fosforilación que es dependiente de la agregación plaquetaria, en la que se fosforilan pp125FAK y el doblete de 95/97 kDa. pp72syk se fosforila durante las dos primeras ondas.<sup>99,100</sup> De hecho syk es la única cinasa que se activa directamente por la ocupación de la integrina.<sup>101</sup>

A pesar de que la región intracitoplasmática de la integrina  $\beta$ 3 no tiene dominio de cinasa (dominios ITAM), si tiene residuos de tirosina, serina y treonina que pueden ser fosforilados para que sean reconocidos por los dominios SH2 de las protein-cinasas y de esta forma se recluten estas cinasas en el tallo citoplasmático de la integrina para conectarse con toda la red de cinasas involucradas en la transducción de la señal de activación. La estimulación plaquetaria se acompaña con un incremento en la actividad glicolítica y la producción oxidativa de ATP, el cual es utilizado en las reacciones de fosforilación.<sup>101</sup>

La síntesis de prostaglandinas juega también un papel importante en la activación plaquetaria. La fosfolipasa A2 libera ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana y este ácido araquidónico es el sustrato de la síntesis de prostaglandinas. La principal prostaglandina plaquetaria es el tromboxano A2 que es un agonista de agregación plaquetaria.<sup>49,50</sup>

Una vez que la plaqueta ha sido activada y se ha llevado a cabo la agregación de las primeras plaquetas, ocurre la reacción de secreción del contenido de los gránulos  $\alpha$  y los gránulos densos. Esta reacción empieza con el incremento del calcio citosólico que es unido por la calmodulina para activar la cinasa de la cadena ligera de la miosina, fosfatasa y la cinasa de AMPc lo que conduce a la centralización de los organelos en anillos contráctiles lo que termina en la secreción del contenido de los mismos. Recordando que algunas de las proteínas y metabolitos contenidos en estos organelos tienen como función la activación plaquetaria como factor von Willebrand, fibrinógeno, fibronectina, ADP, etc. entonces se inicia el reclutamiento de mayor cantidad de plaquetas pero ahora el estímulo viene de las mismas plaquetas, esta reacción incrementa el número de plaquetas que participan en la formación de los trombos plaquetarios.<sup>49</sup>

### Terapia antiagregante

En la sección anterior se ha revisado la participación de las plaquetas en la formación de trombos que se le llamarán "buenos" cuando se forman para cesar una hemorragia y "malos" cuando sin ruptura del vaso sanguíneo se presenta un trombo que obstruye la circulación sanguínea. Desde que se conoció que la aspirina era capaz de inhibir la agregación plaquetaria se usó como terapia antitrombótica preventiva. La aspirina bloquea la actividad de la ciclooxigenasa, una de las enzimas que interviene en el metabolismo del ácido araquidónico para la síntesis del tromboxano A2. Pero la aspirina no puede prevenir la agregación plaquetaria si el estímulo es lo suficientemente fuerte.<sup>102-104</sup> Sin embargo, si se inhibe la unión del fibrinógeno con su receptor entonces sí se puede impedir la agregación plaquetaria. Por tal motivo se han diseñado medidas terapéuticas con el uso de péptidos sintéticos que son capaces de interferir la unión del fibrinógeno, factor von Willebrand y otras proteínas adhesivas.<sup>105</sup> El péptido  $\gamma$ 400-411 inhibe *in vivo* la formación de coágulos hemostáticos en la arteria mesentérica de conejos.<sup>106</sup> En un experimento *ex vivo* este péptido  $\gamma$ 400-411 y el péptido RGDS inhibieron la formación del trombo. La acción de los dos péptidos juntos tiene un efecto aditivo más que sinérgico en la inhibición de la unión de la gpIIb-IIIa con el fibrinógeno.<sup>107</sup> La inhibición del péptido RGDS es mucho mejor que la del péptido  $\gamma$ 400-411 cuando se

usan separados.<sup>108-109</sup> También se han probado péptidos naturales que contienen esta secuencia RGD, estos péptidos existen en los venenos de la víbora del árbol verde (*trigamin*) y de la víbora *Echis carinatus* (equistatin) y son más activos que los péptidos sintéticos.<sup>110-111</sup>

Estos péptidos, *in vitro*, tienen la desventaja de desprender células endoteliales de la matriz extracelular, y pudieran ser de consecuencias para el mantenimiento de la integridad vascular *in vivo*.<sup>112,113</sup> Este efecto no se observó con el péptido  $\gamma$ 400-411. La desventaja que tienen los péptidos sintéticos es que son de vida media muy corta, pero conjugándolos con albúmina se ha logrado ampliar su vida media de minutos a horas.<sup>114-115</sup> Otra forma en la que se puede evitar la agregación plaquetaria es inhibir a la gpIIb-IIIa con el uso de anticuerpos monoclonales. El anticuerpo m7E3 se ha usado en combinación con terapia trombolítica para el tratamiento de infarto agudo del miocardio. También se ha usado este anticuerpo en forma quimérica (c7E3, abciximab, ReoPro).<sup>116,117</sup>

También, en el tratamiento de infartos, se ha usado un heptapéptido cíclico llamado integrilin (Cor Therapeutics, South San Francisco, CA) que es un péptido antagonista de gpIIb-IIIa y un pseudopéptido tirofiban (MK-383, o Aggrastat, Merck rescarh Laboratories, West Point, Pennsylvania). Otro inhibidor de gpIIIb-IIIa es un inhibidor no-peptídico llamado lamifiban (Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland) y se ha usado en combinación con estreptoquinasa, también para el tratamiento de infarto agudo del miocardio.<sup>116,117</sup>

Estos tratamientos todavía están bajo estudio, incluso en nuestro país, y todavía no se tienen resultados de su costo-beneficio.

### Conclusiones

Es muy importante el conocimiento de la fisiología plaquetaria para poder intervenir en las reacciones críticas de la activación para impedir la formación de los trombos que ponen en peligro la vida de millones de personas.

**Bibliografía:**

1. Spaet TH. Platelets: The blood dust. In: Wintrobe MM, ed. Blood pure and eloquent. New York, N.Y. McGraw-Hill 1995: 549-555.
2. Wright JH. The histogenesis of the blood platelets. *J Morphol* 1906; 21:263-274.
3. Wright JH. The origin and nature of the blood platelets. *Boston Med Surg J* 1906; 23: 643-645.
4. Burstein SA, Breton-Gorius J. Megakaryopoiesis and platelet formation. In Williams Hematology. 5a ed. Mc. Graw-Hill, Inc. 1995: 1149-1160.
5. Bruno E, Hoffman R. Human megakaryocyte progenitor cells. *Sem Hematol* 1998; 35(3):183-186.
6. Avraham H. Regulation of megakaryocytopoiesis. *Stem Cells* 1993; 11:449-510.
7. Hoffmann R. Regulation of megakaryocytopoiesis. *Blood* 1989; 74: 1196-1212.
8. Bruno E, Miller ME, Hoffmann R. Interacting cytokines regulate *in vitro* human megakaryocytopoiesis. *Blood* 1989; 73: 67-77.
9. Anghaisuksiri P, Carisen PL, Day EB, et al. Replication and endoreplication in developing megakaryocytes *in vitro*. *Exp Hematol* 1994; 22: 546-550.
10. Gordon MS, Hoffmann R. Growth factors affecting human thrombocytopoiesis: potential agents for the treatment of thrombocytopenia. *Blood* 1992; 80: 302-307.
11. De Sauvage F, Hass P, Spencer S, et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-mpl ligand. *Nature* 1994; 369: 533-535.
12. Lok S, Kaushansky K, Holly R, Kuljper J, et al. Cloning and sequencing of murine thrombopoietin and stimulation of platelet production *in vivo*. *Nature* 1994; 369: 565-568.
13. Kaushansky K, Lok S, Holly R, et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 1994; 369: 568-571.
14. Kaushansky K, Breudy VC, Lin N, et al. Thrombopoietin, the Mpl ligand, is essential for full megakaryocyte development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:3234-3241.
15. Broudy VC, Lin NL, Kaushansky K. Thrombopoietin, the (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy *in vitro*. *Blood* 1995; 88: 1719-1724.
16. Bunting S, Widner R, Lipari T, Rangell L, et al. Normal platelets and megakaryocytes are produced *in vivo* in the absence of thrombopoietin. *Blood* 1997; 90: 3423-3429.
17. Bridell RA, Hoffman R. Cytokine regulation of the human burst-forming unit- megakaryocyte. *Blood* 1990; 76: 431-436.
18. Long MW, Williams N. Immature megakaryocytes in the mouse: Physical characteristics, cell cycle status and *in vitro* responsiveness to thrombopoietic stimulating factor. *Blood* 1982; 59: 413-423.
19. Young KM, Weiss L. Megakaryocytopoiesis: Incorporation of tritiated thymidine by small acetylcholinesterase-positive cells in murine bone marrow during antibody-induced thrombocytopenia. *Blood* 1987; 69:290-297.
20. Bruno E, Murray LJ, DiGusto R, et al. Detection of a primitive megakaryocyte progenitor cell in human fetal bone marrow. *Exp Hematol* 1996; 24: 552-558.
21. Choi ES, Nichol JL, Hokom MH, et al. Platelets generated *in vitro* from progenitor cells displaying human megakaryocytes are functional. *Blood* 1995; 85: 402-413.
22. Dolzhansky A, Basch RS, Karparkin S. Development of human megakaryocytes: I. Hematopoietic progenitors (CD34+ bone marrow cells) are enriched with megakaryocytes expressing CD4. *Blood* 1996; 87:1353-1360.
23. Hogge D, Fanning S, Beckhold K, et al. Quantitative and characterization of human megakaryocyte colony-forming cells using a standard serum-free agarosa assay. *Br J Haematol* 1997; 96: 790-800.
24. Long MW. Megakaryocyte differentiation events. *Sem Hematol* 1998; 35: 192-199.
25. Bruno E, Hoffman R. Human megakaryocyte progenitor cells. *Sem Hematol* 1998; 35: 183-191.
26. Odell TT Jr., Jackson CW. Polyploidy and maturation of rat megakaryocytes. *Blood* 1968; 32: 102-110.
27. Odell TT, Jackson CW, Friday TJ. Megakaryocytopoiesis in rats with special reference to polyploidy. *Blood* 1970; 35:775-782.
28. Corash L. The relationship between megakaryocyte ploidy and platelet volume. *Blood Cells* 1989; 15: 81-93.
29. Paulus JM, Prenant N, Deschamps JF, et al. Polyploid megakaryocytes develop randomly from a multicompartment system of committed progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 79: 4410- 4416.
30. Roth GJ. Developing relationships: arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and leucine-rich- glycoproteins. *Blood* 1991; 77: 5-10.
31. George JN, Nurden AT, Phillips DR. Molecular defects in interactions of platelets with the vessel wall. *N Eng J Med* 1984; 311: 1084-1088.
32. Fox JEB. Identification of actin binding protein as the protein linking the membrane skeleton to glycoproteins on platelet plasma membranes. *J Biol Chem* 1985; 260: 11970-11976.
33. Jackson CW, Hutson NK, Steward SA, et al. A unique talin antigenic determinant and anomalous megakaryocyte talin distribution associated with abnormal platelet formation in the wistar furth rat. *Blood* 1992; 79: 1729-1732.
34. Leven RM, Tablin F. Megakaryocyte and platelet ultrastructure in the wistar furth rat. *Am J Pathol* 1988; 132: 417-421.
35. Beckerle MC, Miller DE, Bertagnolli ME, et al. Activation-dependent redistribution of the adhesion plaque protein, talin, in intact human platelets. *J Cell Biol* 1989; 109: 3333-3334.
36. Aster RH, Jandl JH. Platelet sequestration in man. I. Methods. *J Clin Invest* 1964; 43: 843-847.
37. Murphy EA, Francis ME. The estimation of blood platelet survival. II. The multiple hit theory. *Thromb Diath Haemor* 1971; 25:52-55.
38. International committee for standardization in hematology. Panel on diagnosis applications of radioisotopes in hematology: Recommended method for radioisotope platelet survival studies. *Blood* 1137-1141.
39. Savage B, McFadden PR, Elanson SR, Harker LA. The relation of platelet density to platelet age: Survival of low-and high-density In-111-labeled platelets in baboons. *Blood* 1986; 68: 386-391.
40. Aster RH. Pooling of platelets in the spleen: Role in the pathogenesis of hypersplenic thrombocytopenia. *J Clin. Invest* 1966; 45: 645-656.
41. Harker LX, Finch CA. Thrombokinetics in man. *J Clin Invest* 1969; 48: 963-967.
42. Lee EJ, Schiffer CA. Evidence for rapid mobilization of platelets from the spleen during intensive plateletpheresis. *Am J Hematol* 1985; 19: 161-168.
43. Ware JA, Coller BS. Platelet morphology, biochemistry, and function, in Williams Hematology 5th ed Mc. Graw-Hill, Inc. 1995 pp 1161-1201.
44. López JA, Andrews RK, Afshar Kharghan V, Bernt C. Bernard-Soulier Syndrome. *Blood* 1998; 91(12): 4397-4418.
45. White JG. Anatomy and structural organization of the platelet, in: Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice, 3d ed. RW Colman, Lippincott 1994: 397-313.

46. Walsh PN, Schmaier KH. Platelet-coagulant protein interactions, in: Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. 3d ed. RW Colman. Lippincott 1994: 629-651.
47. Schick P.K. Megakaryocyte and platelet lipids, in: Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. 3d ed. RW Colman. Lippincott 1994: 574-589.
48. White JG. Interaction of membrane systems in blood platelets. *Am J Pathol* 1972; 66:295-299.
49. Gerrard JM, White JG, Rao GHR, Townsend D. Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system. *Am J Pathol* 1994; 83: 283-289.
50. Picot D, Loll PJ, Garavito M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-I. *Nature* 1994;367: 243-247.
51. Fox JEB, Boyles JK, Berndt MC. Identification of a membrane skeleton in platelets. *J Cell Biol* 1988; 106:1525-1533.
52. Fox JEB. The platelet cytoskeleton. *Thromb Haemost* 1994; 70: 884-889.
53. Fox JEB. Linkage of a membrane skeleton to integral membrane glycoproteins in human platelets as glycoprotein Ib. *J Clin Invest* 1985; 76: 1673-1679.
54. Abrams C, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb Haemost* 1991; 65: 467-472.
55. Ugurbil K, Holnisen H, Shulman RG. Adenine nucleotide storage pools and secretion in platelets as studied by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 2227-2240.
56. Kroll MH, Schafer AL. Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood* 1989; 74(4): 1181- 1195.
57. Ferrell Jr. JR, Martin GS. Tyrosine-specific protein phosphorylation is regulated by glycoprotein IIb-IIIa in platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2234-2238.
58. Golden B, Brugge JS, Shattil SJ. Role of platelet glycoprotein IIb-IIIa is agonist-induced tyrosine phosphorylation of platelets proteins. *J Biol Chem* 1990; 111(6): 3117-3127.
59. Kouns WC, Fox CF, Lamoreaux WJ, Coons LB, Jennings LK. The effect of glycoprotein IIb-IIIa receptor occupancy on the cytoskeleton of resting and activated platelets. *J Biol Chem* 1991; 266 (21): 12891-13900.
60. Hynes RO. The complexity of platelet adhesion to extracellular matrices. *Thromb Haemost* 1991; 66 (1) : 40-42.
61. Sultan C, Plantavid NL, Bachelot C, Grondin P, Breton M, et al. Involvement of platelet glycoprotein IIb-IIIa (alphaIIb-beta3 integrin) in thrombin-induced synthesis of phosphatidylinositol 3',4', biphosphate. *J Biol Chem* 1991; 266(35): 23554-23557.
62. Clark EA, Shattil SJ, Ginsberg MH, Bolen J, Brugge JS. Regulation of the tyrosine kinase pp72syk by platelet agonist and the integrin alphaIIb beta3. *J Biol Chem* 1994; 268 (46): 28859-28864.
63. Calvette JJ. Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: the platelet glycoprotein IIb-IIIa complex. *Thromb Haemost* 1994; 72(1): 1-15.
64. Shattil SJ, Gao J, Kashiwagi H. Not just another pretty face: regulation of platelet function at the cytoplasmic face of integrin alphaIIb beta3. *Thromb. Haemost.* 1997; 220-225.
65. Rittenhouse SE. Phosphoinositide 3-kinase activation and platelet function. *Blood* 1996; 88 (12): 4401-4414.
66. Lévy-Toledano S, Gallet C, Nadal F, Bryckaert M, Maclouf J, Rosa J-P. Phosphorylation and dephosphorylation mechanisms in platelet function: a tightly regulated balance. *Thromb Haemost* 1997; 78 (1): 223-226.
67. Martínez MC, Quintana GS. Fisiología de la hemostasis primaria y fisiología de la hemostasis secundaria. En: Manual de hemostasis y trombosis. 1a ed. Ed. Prado 1996: 5-48.
68. Ware JA, Collier BS. Platelet morphology, biochemistry, and function. In: Williams Hematology. 5th ed. Mc Graw-Hill 1995: 1149-1176.
69. Jandrot-Perrus M, Bouton MC, Lanza F, Guillin MC. Thrombin interaction with platelet membrane glycoprotein Ib. *Sem Thromb Hemost* 1996; 22 (2): 151-155.
70. Clementson KJ. Platelet gpIb-V-IX complex. *Thromb Haemost* 1997; 78 (1): 266-270.
71. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995; 268: 233-239.
72. Smith PS, Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules-part I. *N Eng J Med* 1996; 334 (23): 1526-1529.
73. Smith PS, Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules-part II. *N Eng J Med* 1996; 335 (1): 43-45.
74. Phillips DR, Scarborough RM. GPIIb-IIIa: The responsive integrin. *Cell* 1991; 65: 359-362.
75. Sims PJ, Ginsberg MH, Plow EF, Sattil SJ. Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem* 1991; 266 (12): 7345- 7352.
76. Du X, Ginsberg MH. Integrin alphaIIb beta3 and platelet function. *Thromb Haemost* 1997; 78(1): 96-100.
77. Depaetere H, Wille C, Gansemans Y, et al. The integrin alpha2beta1 (gplalphaIIa)-I-domains inhibits platelet-collagen interaction. *Thromb Haemost* 1997; 77 (5): 981-985.
78. Ramachandran R, Klufas AS, Molino M, Ahuja M, et al. Release of the thrombin receptor (PAR-1) n-terminus from the surface of human platelets activated by thrombin. *Thromb Haemost* 1997; 78 (1): 1119-1124.
79. Brass LF, Molino M. Protease-activated G protein-coupled receptors on human platelets and endothelial cells. *Thromb Haemost* 1997; 78(1): 234-241.
80. Jamieson GA. Pathophysiology of platelet thrombin receptors. *Thromb Haemost* 1997; 78(1): 242-246.
81. Lasky LA. Selectins: Interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 1992; 258: 964-968.
82. Frenette PS, Wagner DD. Insights into selectin function from knockout mice. *Thromb Haemost* 1997; 78 (1): 60-64.
83. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2839-2843.
84. Goldsmith HC, Turiitto VT. Rheologic aspects of thrombosis and hemostasis: Basic principles and applications. *Thromb Hemost* 1986; 55: 415-420.
85. Roth GJ. Developing relationships: Arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and leucine-rich glycoproteins. *Blood* 1991; 77: 5-10.
86. Ikeda Y, Handa M, Kawano K. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest* 1991; 78: 1456-1468.
87. Savage B, Ruggeri ZM. Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by glycoprotein IIb-IIIa on nonactivated platelets. *J Biol Chem* 1991; 266:11227-11234.
88. Collier BS, Beer JH, Scudder LE, Steinberg MH. Evidence for a direct interaction of collagen with platelet GPIIb/IIIa and an indirect interaction with platelet GPIIb/IIIa mediated by adhesive proteins. *Blood* 1989; 74:182-188.
89. Saelman EUM, Nieuwenhuis HK, Hese KM, et al. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIIb/IIIa. *Blood* 1994; 83: 1244-1250.
90. Shattil S. Regulation of platelet anchorage and signaling by integrin alphaIIb beta3. *Thromb Haemost* 1993; 70:224-230.
91. Schick PK, Wojenski CM, He X, et al. Integrins involved in the adhesion of megakaryocytes to fibronectin and fibrinogen. *Blood* 1998; 92: 2650-2656.
92. Davaiet L, McGregor JL. Vascular biology of CD36: Roles of this new adhesion molecule family in different disease states. *Thromb Hemost* 1997; 78: 65-69.

93. Sato T, Ohashi Y, Tachibana K, et al. Altered tyrosine phosphorylation via the very late antigen integrin stimulation is associated with impaired T-cell signaling through VLA-a after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997; 90: 4222-4229.
94. Kroll M, Schafer AI. Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood* 1989; 74: 1181-1195.
95. Ferrell JE Jr, Martin GS. Tyrosine-specific protein phosphorylation is regulated by glycoprotein IIb-IIIa in platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2234-2238.
96. Golden A, Brugge JS, Shattil SJ. Role of platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa in agonist-induced tyrosine phosphorylation of platelet proteins. *J Cell Biol* 1990; 111: 3117-3127.
97. Rittenhouse SE. Phosphoinositide 3-kinase activation and platelet function. *Blood* 1996; 88: 4401-4414.
98. Sultan C, Plantavid M, Christilla B, et al. Involvement of platelet glycoprotein IIb-IIIa in the thrombin-induced synthesis of phosphatidylinositol 3',4'-biphosphate. *J Biol Chem* 1991; 266: 23554-23557.
99. Kouns WC, Fox CF, Lamoreaux WJ, Coons LB, Jennings LK. The effect of glycoprotein IIb-IIIa receptor occupancy on the cytoskeleton of resting and activated platelets. *J Biol Chem* 266: 1991; 13891-13900.
100. Shattil SJ, Haimovich B, et al. Tyrosine phosphorylation of pp125FAK in platelets requires coordinated signaling through integrin and agonist receptors. *J Biol Chem* 1994; 269: 14738-14745.
101. Clark EA, Shattil SJ, Ginsberg MH, Bolen J, Brugge JS. Regulation of the protein tyrosine kinase pp72syk by platelet agonists and the alphaIIb-beta3. *J Biol Chem* 1994; 269: 28859-28864.
102. Weiss HJ, Aledort LM. Impaired platelet connective tissue reaction in man after aspirin ingestion. *Lancet* 1967; 2: 495-497.
103. Steering Committee of the US Physicians Health Study Research Group. Final report on the aspirin component of the ongoing Physician's Health Study. *N Eng J Med* 1989; 321: 129-135.
104. Hawiger J. Platelet secretory pathways: An overview. *Methods Enzymol* 1989; 169: 191-195.
105. Hawiger J. Adhesive ends of fibrinogen and its antiadhesive peptides: The end of a saga. *Sem Hematol* 1989; 32: 99-109.
106. Kloczewiak M, Timmons S, Bednarek MA, et al. Platelet receptor recognition domain on the gamma chain of human fibrinogen and its synthetic peptide analogues. *Biochemistry* 1989; 28: 2915-2919.
107. Timmons S, Bednarek MA, Kloczewiak M, et al. Antiplatelet "hybrid" peptides analogous to receptor recognition domains on gamma and alpha chains of human fibrinogen. *Biochemistry* 1989; 28: 2919-2993.
108. Plow EF, Pierschbacher MD, Ruoslahti E, et al. Arginyl-glycyl-aspartic acid sequences and fibrinogen binding to platelets. *Blood* 1987; 70: 110-115.
109. Ruggeri ZM, Houghten RA, Russell SR, et al. Inhibition of platelet function with synthetic peptides designed to be high-affinity antagonists of fibrinogen binding to platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5708-5712.
110. Gang Z-R, Gould RJ, Jacobs JW, et al. Echistatin. A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper *Echis carinatus*. *J Biol Chem* 1988; 263: 11891-11894.
111. Huang TF, Holt JC, Lukasiewicz H, et al. Triggamin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem* 1987; 262: 16157-16163.
112. Chen CS, Hawiger J. Reactivity of a synthetic peptide analogous of adhesive proteins in regard to the interaction of human endothelial cells with extracellular matrix. *Blood* 1991; 77: 2200-2206.
113. Cheresch DA. Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 6471-6475.
114. US Patent Office. Method of inhibiting and inducing human platelet aggregation. Patent no. 4661471.
115. US Patent Office. Method of producing biologically active molecules having extended life time. Patent no. 4703039.
116. Vande Werf F. Clinical trials with glycoprotein IIb-IIIa receptor antagonists in acute coronary syndromes. *Thromb Haemost* 1997; 78: 210-213.
117. Cheng JE. Platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin blockade: Recent clinical trials in interventional cardiology. *Thromb Haemost* 1997; 78: 205-209.



## APÉNDICE

### MARCO TEÓRICO

---

En el artículo anterior se revisó la función, primordial, de la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  en la fisiología de las plaquetas. También se revisó el papel que juegan otros miembros de esta familia en las funciones de adhesión y agregación plaquetaria. Ahora en este artículo se presenta la información relacionada a la función que realizan estos receptores en el reconocimiento de del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), así como su propagación a otras células.

### 3. INTEGRINAS

**Domínguez V** y Rosales C. Integrins: their role in ligand recognition and cell activation in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Revista de Hematología*. 2001(b); 2: 46-54. Artículo de revisión

# Integrins: their role in ligand recognition and cell activation in human immunodeficiency virus type 1 infection

<sup>1,2</sup>M en C Ma. Victoria Domínguez García, <sup>1</sup>Dr. Carlos Rosales Ledezma

## Abstract

Integrins are glycoprotein membrane receptors. They bind soluble ligands, as well as cell membrane ligands. These receptors are heterodimers of one of sixteen  $\alpha$  subunits and one of eight  $\beta$  subunits. Integrins recognize the outside activation signal on a specific site of their extracellular domain. The activation signal is transduced inside through their  $\beta$  chain intracytoplasmic domain. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infects CD4 bearing cells. But the infection process is more successful when a HIV-infected cell fuses with an uninfected cell. LFA-1 ( $\alpha$ L $\beta$ 2, CD11a/CD18) and VLA-3 ( $\alpha$ 3 $\beta$ 1) integrins have a relevant role in syncytia formation for spreading HIV-1 into the host cells. The HIV-tat protein is able to bind some integrin receptors ( $\alpha$ 5 $\beta$ 1,  $\alpha$ V $\beta$ 5 and  $\alpha$ V $\beta$ 3) upregulating the expression of  $\beta$ 2 integrins, making cells more adhesive. It has been postulated that tat protein is the responsible factor in the pathogenesis of Kaposi's sarcoma. Even though the knowledge of adhesive function is extensive, the role of these molecules in HIV pathogenesis is still under study. This review will deal with the relationship between integrin proteins from immune system cells and HIV-1 infection.

Key words: HIV-1, integrins, platelets

## Resumen

Las integrinas son receptores glucoproteicos de la membrana celular. Unen ligandos solubles o unidos a membranas. Están compuestos por una de dieciséis cadenas  $\alpha$  unida no covalentemente a una de ocho cadenas  $\beta$ . Las integrinas reconocen la señal de activación externa y la envían hacia el interior de la célula a través de un dominio intracitoplasmático de la cadena  $\beta$ .

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) infecta a células CD4+. El proceso de infección ocurre mejor cuando se fusiona una célula infectada con una célula virgen, con la participación de integrinas como LFA-1 ( $\alpha$ L $\beta$ 2, CD11a/CD18) y VLA-3 ( $\alpha$ 3 $\beta$ 1). Además, la proteína tat del VIH-1 se une a estos receptores ( $\alpha$ 5 $\beta$ 1,  $\alpha$ V $\beta$ 5 and  $\alpha$ V $\beta$ 3) aumentando la expresión de las integrinas de la familia  $\beta$ 2, volviendo a la célula más adherente. Esta proteína tat es un factor responsable de la patogénesis del sarcoma de Kaposi. A pesar de que se conoce mucho de la función adhesiva de estos receptores, el papel que juegan estas moléculas en la patogénesis del SIDA todavía está en estudio. El objetivo de este artículo es revisar la relación que existe entre las integrinas de las células del sistema inmune en la infección por el VIH-1.

Palabras clave: integrinas, VIH-1, Plaquetas.

## Introduction

Integrins are glycoprotein receptors. They bind soluble ligands, as well as cell membrane ligands. Integrins are heterodimers of one of sixteen  $\alpha$  subunits and one of eight  $\beta$  subunits. The  $\alpha$  and  $\beta$  chains are non covalently associated. Both chains have a large extracellular domain, a single spanning transmembrane region, and a short intracytoplasmic domain.<sup>1,3</sup>

Integrins recognize the outside activation signal through a specific site of their extracellular domain. The activation signal is transduced inside through their  $\beta$  chain intracytoplasmic domain. In this way integrins trigger the cell signal transduction pathway. The result of this integrin activation will make cellular changes depending on: the cell type, the class of integrin molecule, and the lig-

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F.

<sup>2</sup>Banco Central de Sangre, Centro Médico Nacional SXXI, IMSS México, D.F.

## Correspondencia:

M en C Ma. Victoria Domínguez. Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510. Teléfono 56-22-38-54. Fax 56-22-33-69

and. Integrins play a major role in biologic processes such as: embryonic development, wound repair, apoptosis, hemostasis, cell tumor growth, metastasis, integrity of blood vessels, and leukocyte homing and leukocyte activation.<sup>2-5</sup> Among all these biologic processes, homing and leukocyte activation are important events in the immune system response to an infectious agent. The immune system triggers the necessary mechanisms that will destroy the infectious agent. In the specific case that the infecting agent is the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), the immune system will not be able to trigger an adequate response due to the fact that immune system cells are the target for the virus infection.<sup>6-8</sup>

It is known that HIV-1 infects CD4 bearing cells: T lymphocytes, monocytes, dendritic cells, macrophages, and glial cells.<sup>9-16</sup> Also it is known that HIV is cytopathic of CD4 T cells, and these cells are completely depleted. Patients in this stage have a severe immune deficiency, this stage is called the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). The clinical features from AIDS patients are infections by opportunistic agents and wasting syndrome.<sup>18,19</sup>

In early stages of HIV infection, when the CD4 T cells counts are still normal, there are an impair immune function, this stage is called the AIDS related complex (ARC). The clinical features from ARC patients are recurrent bacterial infections of skin, mucous membranes and intestinal tract.<sup>19,20</sup>

The clinical features from ARC patients are quite similar to leukocyte adhesion deficiency (LAD) patients. The leukocyte adhesion deficiency is a genetic disorder, in which there is no expression of integrin  $\beta 2$  chains. Leukocytes from subjects affected with leukocyte adhesion deficiency have altered leukocyte function. The clinical features in LAD patients are recurrent infections of skin, mucous membranes, and intestinal tract.<sup>21,22</sup>

This review will deal with the relationship between integrin proteins from immune system cells and HIV-1 infection.

## Integrins

Cells of a multicellular organism are in permanent communication. Direct communication can be done through a membrane protein on the cell and their counterpart receptor on the other cell.

Indirect communication also is possible. One cell produces and releases a protein into the surrounded space and the other cell receives it. In both cases, cells need surface receptors for getting the message.

Several protein adhesion receptors have been identified. These receptors are classified into families: the cadherins, the immunoglobulin super-family of adhesion receptors, the selectins, and the integrins. We have special interest in those members of integrin family that are expressed on the surface membrane of immune system cells.

There are several, excellent, integrin protein reviews.<sup>1-5,26-28</sup> It is beyond our scope to do another one. We only mention some relevant features.

Integrin molecules consist of two non covalently associated  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. Both chains have a large extracellular domain, a single transmembrane spanning region, and a short cytoplasmic tail at the carboxi terminus. The exception is the integrin  $\beta 4$  subunit, which has a long intracellular domain. The  $\alpha$  or  $\beta$  subunits have 40-48% homology among them and are conserved over a wide variety of species including mammals, birds, amphibians, insects, and fungi.<sup>1</sup> The association of sixteen different  $\alpha$  chains (Mr 120 to 180 kDa) with eight different  $\beta$  chains (Mr 90 to 110 kDa) heterodimerize to form at least twenty receptors. These receptors mediate interactions cell-cell and cell-extracellular matrix.<sup>3-5,23-25</sup> Thus integrin family function is to communicate the cell between the extracellular environment and the intracellular cytoskeleton.<sup>26-28</sup>

Integrin family can be subdivided into classes based on the  $\beta$  subunits. There are three principal classes or subfamilies:  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ , and  $\beta 3$ . Less is known about  $\beta 4$  through  $\beta 8$ .

The  $\beta 1$  class is the most widely distributed. It is known as very late antigens (VLA). VLA molecules appear on lymphocyte surface several days after mitogen or antigen activation. Seven receptors have been identified:  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$  (collagen receptor),  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$  (VCAM-1 receptor),  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 1$  (fibronectin receptor), and  $\alpha 6\beta 1$  (laminin receptor).

$\alpha 2\beta 1$  (GPIIb/IIIa, CD49b/CD29) is the receptor for collagen and laminin on endothelial cells. It is also the receptor for echovirus-1 (echovirus belongs to *enterovirus* from Picornarividae family).<sup>23,26,27</sup>  $\alpha 4\beta 1$  surface expression is upregulated on memory T lymphocytes.<sup>26-28</sup>

The  $\beta 2$  class is restricted to leukocytes. It is known as CD11a-c/CD18 antigens. This class consists of three adhesion receptors: LFA-1, MAC-1, and p150,95.

LFA-1 ( $\alpha L\beta 2$ , CD11a/CD18) is expressed on all leukocyte membranes. LFA-1 has an important role in the leukocyte-leukocyte and leukocyte-endothelial cell interactions. It is involved in natural killer cell (NK), T helper cell (Th), and antibody-dependent cytotoxic cell (ADCC) functions. The ligand for LFA-1 is the glycoprotein ICAM-1. ICAM-1 is a member of the immunoglobulin superfamily. It is low expressed on almost all cell membranes, but on leukocytes, endothelial cells and epithelial cells is upregulated by cytokines, endotoxins and phorbol esters. ICAM-1 is the *rhinovirus* receptor (*rhinovirus* belongs to Picornaviridae family).<sup>25,30,31</sup>

Co-capping studies have demonstrated the LFA-1-Fc $\gamma$ RIIIB association. Fc $\gamma$ RIIIB (CD16b), expressed only on neutrophils, is a glycosylphosphatidyl (GPI)-linked membrane protein and therefore lacks the transmembrane and cytoplasmic sequences that are needed to mediate conventional signaling, even though it is competent to elicit transmembrane signals and effector functions.<sup>32-34</sup>

MAC-1 ( $\alpha M\beta 2$ , CD11b/CD18, Mo-1, CR3) is found on neutrophils, monocytes and some lymphocytes. Mac-1 is a promiscuous receptor, its ligand repertoire includes iC3bi (a breakdown product of the third complement component), coagulation factor X, fibrinogen, endotoxin, and also ICAM-1.<sup>32-34</sup>

The  $\beta 3$  class consists of two receptors: The glycoprotein complex IIb/IIIa ( $\alpha IIb/\beta 3$ ), and  $\alpha V\beta 3$ .

GPIIb/IIIa ( $\alpha IIb/IIIa$ ) is mainly found on platelets, megakaryocytes, and endothelial cells. It is the receptor for several soluble adhesive proteins: fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor, thrombospondin, and vitronectin. In contrast to other integrins, GPIIb/IIIa is nonfunctional on resting platelets. Activated platelets by thrombin or ADP can bind its ligands.<sup>2-4,26-28</sup>

The sequence Arg-Gly-Asp (RGD) is a common sequence in the GPIIa/IIIb ligands. This sequence is recognized by GPIIb/IIIa. The fibrinogen  $\gamma$  chain has another sequence (HHLGGAKQAGDV) that also is recognized by this receptor.

$\alpha V\beta 3$  is found on endothelial cells from large vessels. It is the vitronectin, fibrinogen, thrombospondin, and von Willebrand factor receptor.<sup>2-4,26-28</sup>

It is known that the integrin  $\beta$  chain cytoplasmic domain is necessary and sufficient to target integrins to focal adhesions with cytoskeletal proteins, after ligand binding. Talin and  $\alpha$ -actinin bind to  $\beta$  chain cytoplasmic domain. Also tensin and vinculin have been found in this interactions. Actin filaments may link to integrins through talin,  $\alpha$ -actinin, tensin, and vinculin interactions. The actin filaments polymerization produces shape changes and cell movement.<sup>23</sup>

Tyrosine phosphorylation is one of the earliest events detected in response to integrin stimulation. Several tyrosine kinases as FAK, src, fyn lyn are involved. Serine-threonine kinases families as PKC, and MAP are also activated upon integrin stimulation.

Also it is well documented the pH increase, Ca<sup>2+</sup> influx, phosphatidyl turn over, and phospholipase activation, when the occupation of integrin receptors occur.<sup>1-5,26-28,35</sup>

Actually several signaling pathways can be activated when integrins are engaged. This signaling pathways are the tyrosine kinase (also known as the Ras pathway), the G-protein, and others like the JAK-STAT and the sphingolipid pathways.<sup>1-5,26-28</sup>

As we can see integrin engagement is an important event for cell activation. If there is an integrin inhibitor, cells will not be able to function correctly.

### The human immunodeficiency virus

The HIV belongs to lentiviruses group of the retroviruses family (Retroviridae). It has a two strand RNA genome, and a reverse transcriptase enzyme that makes a DNA copy from RNA. The virion is about 100 to 150 nm in diameter. It is roughly circular in shape.<sup>7,8</sup>

This is an enveloped virus. The envelope is derived from the host cell membrane, and it is composed of lipid or fatty material. On the inside of

the envelope there is a protein called the matrix protein or p17. On the outside of the envelope there are two viral glycoproteins. These two envelope glycoproteins are the gp120 (Mr 120 kDa) and the gp41 (Mr 41 kDa). Gp120 and gp41 are derived from gp160 splicing. Gp41 is attached to envelope through its transmembrane domain, and gp120 binds non-covalently to gp41.

The capsid is the virus inner core, which surrounds the nucleic acid. It is characteristically cone-shaped. The main core protein is p24 (Mr 24 kDa).<sup>15,36,37</sup>

The genome of HIV is less than 10 kilobases in length. It is composed of three genes: the gag gene (codes for the matrix and core proteins), the env gene (codes for the envelope proteins), and the pol gene (codes for polymerase or reverse transcriptase, ribonuclease, integrase and protease).

Also, in common with the other retroviruses, HIV possesses at either end of his genome a segment of nucleic acid called the long terminal repeat (LTR). LTR regulates and controls whether the three structural genes are turned on, or are turned off.

There are other genes called regulatory genes. These can be divided into three groups: positive regulatory genes, negative regulatory genes and regulatory genes. The positive regulatory genes are tat, rev, vif, and vpr genes. The tat gene (transactivator of transcription) codes for protein tat. Protein tat attaches to virus RNA TAR site. This promotes the transcription of messenger RNA for proteins manufacturing.

The rev gene (regulator of expression of viral proteins) functions as a genetic switch, it activates virus from a latent state to an active infectious virus. The vif gene (virus infectivity factor) codes for a protein that promotes the assembly of virus components. The vpr gene (viral protein r) promotes the release of infectious virus from cells.

The negative regulator gene, nef (negative factor) codes for proteins which attach to NRE (negative regulatory element) into LTR. Nef inhibits the production of structural proteins

The regulatory genes, vpr (viral protein r) and vpt (viral protein t).<sup>7,8,15,36</sup>

## Replication of HIV

The first step for virus replication is the gp120 attachment to CD4 protein of the host cell as the main receptor. The fusin and CC chemokines receptors such as CC CKR3 and CC CKR5 are used as coreceptors.<sup>38-42</sup>

If the host cell is activated, the second step will occur.<sup>43,44</sup> In this second step the gp 41 causes host cell and virus membranes fusion, which permits the virus to enter the cell. Once inside the cell the core capsid protein breaks open releasing the two strands of the virus RNA. The reverse transcriptase makes a DNA copy from each RNA strands. The integrase helps this DNA to integrate into the host cell genome.<sup>36,45</sup> Once the DNA is integrated, it is transcribed into messenger RNAs for the viral proteins manufacture as well as the RNA that will be used for the progeny virus. All these events are controlled by virus regulatory genes as well host cell regulatory genes. Once the virus RNA and proteins are made, the virus assembly occurs. Then the new virus particles are released from the cell and these are able to infect other cells. The host cell is destroyed when the virus particles are budding from the cell.<sup>10,15,36</sup>

New cells can be infected by free virus particles or by direct non infected cell-infected cell interactions. HIV-infected cells express viral gp120 on their membranes. GP120 bearing cells attach to CD4 on the other cell. Similar mechanism as the free virus cell entrance can now occur. The two cell membranes fuse to permit that virus particles infect the other cells. These cell membranes fusion is repeated once and twice and so on until a giant multinucleated cell is formed. This giant cell is called syncytium, which generally is formed with ten to fifty fused cells; however syncytia from two hundred fused cells have been seen. The syncytia are preferentially formed in lymphoid organs rather than peripheral blood cells (46,47). Cells involved in the syncytium are non functional, moreover the syncytia are rapidly destroyed.<sup>9</sup>

It has been mentioned that HIV-1 proteins gp120, and gp41 play important role in the cell viral infection; in the same way the host cell has proteins that regulate the fusogenic process.

As we know the host cell must have receptors for the virus such as CD4, fusin, and CC chemokine proteins, but host cell needs other protein that can regulate the cell membrane fusion. This regulatory

protein is the integrin LFA-1. If this integrin is inhibited by monoclonal antibodies to the  $\beta 2$  subunit, the syncytia formation is completely blocked, but antibodies to the  $\alpha L$  subunit the syncytia formation is not completely blocked. This suggests that the fusogenic process depends on the  $\beta$  chain functionality.<sup>48,56</sup> Other studies have demonstrated the main role of  $\beta$  chain into cell membrane fusion, in such studies lymphocytes from LAD patient were used, as it was mentioned before these leukocytes lack the  $\beta 2$  integrins on their cell membrane. However LAD lymphocytes were HIV infected *in vitro*, they were unable to form syncytia.<sup>49</sup>

### **Integrins and human immunodeficiency virus type 1**

The latency period in HIV-1 infection is different from other viral infections such as herpes viruses, where the viral replication and disease manifestations appear concordantly after long intervals of silence. In contrast, in the acute viral syndrome of HIV-infection, that sometimes follows primary exposure to virus, there are high peak levels of cell-associated and cell-free virus in the peripheral blood. Thereafter in the asymptomatic phase of disease, the viral load in peripheral blood is low; however, there are high levels of virus replication in lymphoid organs.<sup>50,51</sup> Actually the lymphoid organs are sites where the most virus replication occurs, and they are HIV reservoirs.

Some CD4-infected cells remain in the peripheral blood. This has been demonstrated by the presence of viral RNA into cells. If these cells, which are in G<sub>0</sub> phase of the cell cycle, are activated, then HIV-1 replication occurs.<sup>10,13,43,44</sup> As we mentioned before integrins molecules play a main role in the leukocyte activation, motion, and homing to lymphoid organs. We divide this review into the next items: a) HIV-1 infected cells and cell membrane fusion; b) The integrin ligand HIV-1 tat protein; c) Apoptosis and integrin proteins in HIV-1 infected cells; d) Integrin autoantibodies in HIV-1 infected patients.

#### **a) HIV-infected cells and cell membrane fusion**

There are three main ways that HIV-1 uses to infect a host: sexual (homosexual and heterosexual) parenteral (as transfusion of HIV-1 contaminated blood derivatives, the use of HIV-1 contaminated syringes by drug users), and materno-fetal.

In the sexual way, Langerhans cells (LCs), dendritic cells (DCs), and macrophages are the first cells that can be infected. Of course these cells bear the CD4 receptor. The oral cavity, anus, vagina, and uterine cervix are covered with a stratified squamous epithelium that is rich in Langerhans cells and macrophages. Infected Langerhans cells migrate to the dermis, submucosa, and lymph nodes. These tissues are rich in dendritic cells and CD4 T cells. CD4 T cells are infected into these tissues.

Langerhans cells and dendritic cells are better antigen presenting cells than macrophages and B lymphocytes, they fuse their membrane to T cells. It is in these LC-T cell, and DC-T cell syncytia, rather than free cells that viral p24 protein and virions are produced.<sup>9,52-55</sup>

Studies *in vitro* have demonstrated that T lymphocytes-monocytes syncytia can be formed by large amounts of cells, and also one syncytium fuses with other syncytium. However the great complexity the syncytia are highly organized and motile.<sup>54,55</sup>

If the parenteral or materno-fetal ways are the routes for virus infection, CD4 T lymphocytes and monocytes are the first cells infected. These cells move to lymphoid organs, and then the membranes are fused, the virus replication occurs and so on, the LCs and DCs are infected. The entire process involves gp120, and gp41 from HIV and CD4, fusin, CC chemokines receptors, and of course integrin proteins from the host cell.<sup>38-42,46-49</sup>

As it was mentioned before the participation of LFA-1 ( $\alpha L\beta 2$ , CD11a/CD18) in syncytia formation has been demonstrated by using monoclonal antibodies to CD18. These antibodies block intercellular adhesion of leukocytes, including that of T lymphocytes, and monocytes. They also block adhesion-dependent functions such as lymphocyte-mediated cytotoxicity and induction of T cell proliferation.<sup>48,56</sup> T lymphocytes obtained from a LAD patient were unable to fuse and form syncytia when these T cells were infected with HIV-1 or HIV-2, despite the fact that T cells were efficiently infected.<sup>49</sup>

There is evidence that  $\beta 1$  integrins also participate in cell membrane fusion, specifically the VLA-3 integrin. Antibodies to  $\alpha 3$  or antibodies to  $\beta 1$  inhibit fusion.<sup>57</sup>

Before cell membrane fusion occurs, cells involved must be in contact. As it was mentioned before integrin family mediate cell-cell, and cell-matrix extracellular interactions.

The adhesion of HIV-1 infected cells and the integrin molecules expression have been determined. HIV-1 infected T lymphocytes are more adherent to fibronectin (extracellular matrix protein) than non infected lymphocytes. The adherence was inhibited by antibodies to  $\alpha 5$  or  $\beta 1$  subunits of the classical fibronectin receptor. In addition the adherence also was inhibited by one peptide with the amino acid sequence Arg-Gly-Asp (RGD). This suggest that the more adherent phenotype is due to integrin protein. The increased adhesion correlated with 2.5 fold in integrin synthesis, which finally ends on the integrin membrane over expression.<sup>58</sup> Besides increased expression of  $\alpha 5 \beta 1$  on lymphocytes, the expression of LFA-1 was also upregulated.<sup>59</sup>

HIV-1 infected monocytes display a threefold more adherent phenotype, than uninfected control cells, to laminin and human capillary endothelial cells monolayer. The attachment to laminin enhanced the virus replication.<sup>60</sup> The adherence was inhibited by monoclonal antibodies to LFA-1 or ICAM-1.<sup>61</sup> By the way ICAM-1 is also upregulated on macrophages<sup>62</sup>, then upregulation of the two receptors LFA-1 and ICAM-1 pair is now available to function.

#### b) The integrin ligand HIV-tat protein

The HIV-tat protein is a transcription transactivation factor, that is able to bind integrin receptors. When recombinant tat protein is bound to monocytes, tat protein upregulates the expression of  $\beta 2$  integrins; this upregulation in integrin expression become monocytes more adherents to endothelial cells, and also induce monocytes to form aggregates themselves.<sup>63</sup> Added to monocytes, HIV-tat protein is uptaked by fetal astrocytes, fetal neurons, glial macrophages, and neuroblastoma cells.<sup>64,65</sup>

$\alpha 5 \beta 1$ ,  $\alpha V \beta 5$ , and  $\alpha V \beta 3$  are the receptors for HIV-tat protein. Similar to fibrinogen, one of the natural ligands for  $\alpha IIb \beta 3$  and  $\alpha V \beta 3$  integrins, tat protein has two binding domains; one is the amino acid sequence Arg-Gly-Asp (RGD), and the other the basic domain ( amino acid sequence RKKRRQRRR).<sup>66-69</sup>

Kaposi sarcoma is an endothelial cell neoplasia that is frequently found in adults AIDS patients. It has been postulated that tat protein is the responsible factor in the pathogenesis of Kaposi sarcoma. In the presence of inflammatory cytokinas (interleukina 1, interleukina 6, tumor necrosis factor and oncostatin M), tat protein promotes the adhesion, migration, and morphogenesis of vascular endothelial cells, and AIDS Kaposi sarcoma cells.<sup>69,70</sup>

#### c) Apoptosis and integrin proteins in HIV-infected cells

Apoptosis is the name of the mechanism of programmed cell death. It has been proposed that CD4 T cell depletion, in HIV-1 infection, is due to unchecked apoptotic cell death. The CD4 T cells that are depleted can be HIV-1 infected cells and also uninfected CD4 T cells. This suggest, that the aberrant cell death is caused by soluble factors rather than a direct cytotoxic action of viral particles. Priming for apoptosis required two concomitant signals present on the same antigen presenting cell, an antigenic stimulus and a second signal provided by the HIV-1 gp120.<sup>71-75</sup>

It has been demonstrated that  $\beta 1$  integrin, which is a costimulatory signal in the T cell antigenic response, rescue various cell types from undergoing apoptosis.<sup>75</sup>

In HIV-1 infected T cells, the integrin-mediated costimulatory signal of TCR for inducing T cell proliferation and protection from aberrant cell death is absent. The impair function in integrin response correlates with a failure of the integrin generated signal to induce FAK expression, and protein kinase C activation.<sup>74</sup> Protein kinase C activity is also inhibited by HIV-1 gp41 protein.<sup>76,77</sup> However the gp41 inhibitor mechanism is unknown, it seems that gp41 interacts directly with cytoplasmic  $\beta 1$  integrin domain, and this interaction inhibits the cytoplasmic integrin function.<sup>76,77</sup> Actually the  $\beta 1$  generated signal of cell activation is the real mechanism that rescue lymphocytes from the apoptotic process.

#### d) Integrin autoantibodies in HIV-1 infected patients

Autoantibodies and cell autoreactivity are common characteristics of nearly all virus infections. In man, Epstein Barr virus, cytomegalovirus, influ-

enza, adenoviruses, chickenpox, and coxsackie viruses induce autoantibodies. These antibodies do not play a role in the pathogenesis, unless they are directed to the heart.<sup>78-80</sup>

On the contrary, in HIV-1 infection, autoantibodies do play an important role in the pathogenesis. The autoimmune manifestations of HIV disease involve: skin (seborrheic dermatitis, psoriasis, moluscum contagiosum, pemphigoid), joint (Reiter's syndrome, psoriatic arthritis, vasculitis, Sögren's syndrome), hematological (autoimmune thrombocytopenic purpura, neutropenia, aplastic anemia), and neurological changes (acute and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, sensory ganglioneuritis, etc).<sup>78-81</sup>

Two theories try to explain the presence of autoantibodies, one is the virus polyclonal B cell activation, and the other the mimicry molecular between HIV-1 proteins and host proteins.

There are many reports about the mimetic domains proteins such as HIV-1 gp120 and major histocompatibility complex class II (MHC-II), major histocompatibility complex class I (MHC-I), complement C1q protein, interleukin 2 (IL-2) etc. The HIV-1 gp41 also has mimicry molecular with MHC-II, MHC-I molecules and neuroleukin.<sup>78-81</sup>

Among the wide range of clinical disorders in HIV-1 infection, thrombocytopenia is one of the more frequent, already 30 percent of the HIV-1 infected subjects have thrombocytopenia.

It has been known that most of HIV-1 infected patients with thrombocytopenia have antiplatelet antibodies.<sup>82-85</sup> GPIIb/IIIa is the main target antigen, and some antibodies are directed to  $\beta 3$  intracytoplasmic domain.<sup>84-86</sup>

It was found that sera from most of HIV-1 infected patients have antibodies to a synthetic pep-

tide from intracytoplasmic  $\beta 3$  integrin. There was no correlation with platelet blood counts, which demonstrated that these antibodies are not involved in the thrombocytopenia pathogenesis. This study showed that antibodies are directed to HIV-1 gp41 and cross react with the  $\beta 3$  cytoplasmic domain; the epitope from these two proteins have structural homology.<sup>86,87</sup>

These studies suggest that HIV-1 gp41 antibodies may be cross react with the intracytoplasmic domains from other integrins due to the integrin intracytoplasmic domains are highly conserved. If this hypothesis is true HIV-1 gp41 protein could be an integrin inhibitor of immune cell responses.

## Conclusions

Even though the knowledge of adhesive integrin function is extensive, the role of these integrin molecules in HIV pathogenesis is still under study.

As we can see HIV integrins cooperate in HIV spreading into all host tissues, upregulating the integrin expression and facilitating the syncytia formation.

Paradoxically HIV-1 gp41 protein has an inhibitor role in the integrin signal transduction, which become immune cells low responsive, besides the direct cytotoxic effects that destroys the host cells, evenmore the indirect effects on increased apoptotic cell death.

Further investigation is needed to understand the mechanism involved in the interactions between HIV and integrin molecules.

Most of the therapeutic approach is based in inhibition of viral replication. If we could find a way to block the viral spreading, we will have better weapons to combat the virus.

## References

1. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995; 268: 233-239.
2. Rosales C, O'Brien V, Kornberg L, Juliano R. Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochem Biophys Acta* 1995; 1242: 77-89.
3. Rosales C, Juliano RL. Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes. *J Leuk Biol* 1995; 57: 189-198.
4. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules-part I. *N Eng J Med* 1996; 334(23): 1526-1529.
5. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules-part II: Blood vessels and blood cells. *N Eng J Med*. 1996; 335(1): 43-45.
6. Gallo RC, Montagnier L. AIDS in 1988. *Scient Am* 1988; 259(4): 25-32.
7. Haseltine WA. Molecular biology of the AIDS virus: ten years of discovery. Hope for the future. In: *Science Challenging AIDS*. 1992 Basel, Karger pp 71-106.
8. Essex M, Kanki PJ. The origins of the AIDS virus. *Scientific Am* 1988; 259(4): 44-51.
9. Cameron P, Pope M, Granelli-Piperno A, Steinman RM. Dendritic cells and the replication of HIV-1. *J Leuk Biol* 1996 59: 158-171.
10. Embretson J, Zupancic M, Ribas JL, Burke A, Racz P, Tenner-Racz K, Haase AT. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 1993; 362: 359-362.
11. Fan S-T, Hsia K, Edgington TS. Upregulation of human immunodeficiency virus-1 in chronically infected monocytic cell line by both contact with endothelial cells and cytokines. *Blood* 1994; 84(5): 1567-1572.
12. Koenig S, Gendelman HE, Orenstein JM, Dal Canto MC, Pezeshkpour GH, Yungbluth M, Janotta F, Aksamit A, Martin MA, Fauci AS. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 1986; 233: 1089-1093.
13. McCune JM. Viral latency in HIV disease. *Cell* 1995; 82: 183-188.
14. Vazeux R, Brousse N, Jarry A, Henin D, Marche C, Vedrenne C, Mikol J, Wolf M, Michon C, Rozenbaum W, Bureau J-F, Montagnier L, Brahic M. AIDS subacute encephalitis. Identification of HIV-infected cells. *Am J Pathol* 1987; 126(3): 403-410.



15. Weber JN, Weiss RA. HIV infection: the cellular picture. *Scientific Am* 1988; 259(4): 81-87.
16. Wiley CA, Schrier RD, Nelson JA, Lampert PW, Oldstone BA. Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immune deficiency syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 7089-7093.
17. Haseltine WA, Wong-Staal F. The molecular biology of the AIDS virus. *Scientific Am* 1988; 259(4): 34-42.
18. Larralde C, Huerta L. Network between main protagonists and events leading to AIDS. *Arch Med Res* 1996; 27(2): 107-113.
19. Redfield RR, Burke DS. HIV infection: the clinical picture. *Scientific Am* 1988; 259(4): 70-78.
20. Robin H.S. Immunologic aspects of AIDS. In *AIDS Arlington VA*. 1986; pp 23-37.
21. Anderson DC, Springer TA. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and P150,95 glycoproteins. *Ann Rev Med* 1987; 38: 175-194.
22. Hibbs ML, Wardlaw AJ, Stacker SA, Anderson DC, Lee A, Roberts TM, Springer TA. Transfection of cells from patients with leukocyte adhesion deficiency with an integrin beta subunit (CD18) restores lymphocyte function-associated antigen-1 expression and function. *J Clin Invest* 1990; 85: 674-681.
23. Hauzenberger D, Klominek J, Holgersson J, Bergström S-E, Sundqvist K-G. Triggering of motile behavior in T lymphocytes via cross-linking of  $\alpha 4 \beta 1$  and  $\alpha L \beta 2$ . *J Immunol* 1997; 158: 76-84.
24. Keizer GD, Visser W, Vliem M, Figdor CG. A monoclonal antibody (NKI-L 15) directed against a unique epitope on the  $\alpha$ -chain of human leukocyte function-associated antigen 1 induces homotypic cell-cell interactions. *J Immunol* 1988; 140: 1393-1400.
25. Kolanus W, Nagel W, Schiller B, Zeitlmann L, Godar S, Stockinger H, Seed B.  $\alpha L \beta 2$  integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell* 1996; 86: 233-242.
26. Newton RA, Thiel M, Hogg N. Signaling mechanisms and the activation of leukocyte integrins. *J Leuk Biol* 1997; 61: 422-426.
27. Pakianathan DR. Extracellular matrix proteins and leukocyte function. *J Leuk Biol* 1995; 57: 699-702.
28. Petty HR, Todd III RF. Integrins as promiscuous signal transduction devices. *TRENDS Immunol Today* 1996; 17(5): 209-211.
29. Chang AC, Salomon DR, Wadsworth S, Hong M-J, Mojick CF, Otto S, Shavach EM, Coligen JE.  $\alpha 3 \beta 1$  and  $\alpha 6 \beta 1$  integrins mediate laminin/merosin binding and function as costimulatory molecules for human thymocyte proliferation. *J Immunol* 1995; 154: 500-510.
30. Van der Vieren M, Trong HL, Wood CL, Moore TSJ, Staunton DE, Gallatin WM. A novel leukointegrin,  $\alpha d \beta 2$ , binds preferentially to ICAM-3. *Immunity* 1995; 3: 683-690.
31. Wei J, Shaw LM, Mercurio AM. Integrin signaling in leukocytes: lessons from the  $\alpha 6 \beta 1$  integrin. *J Leuk Biol* 1997; 61: 397-407.
32. Wahl SM, Feldman GM, McCarthy JB. Regulation of leukocyte adhesion and signaling in inflammation and disease. *J Leuk Biol* 1996; 59: 789-796.
33. Wang SCT, Kanner SB, Ledbetter JA, Gupta S, Kumar G, Nel AE. Evidence for LFA-1/ICAM-1 dependent stimulation of protein tyrosine phosphorylation in human B lymphoid cell lines during homotypic adhesion. *J Leuk Biol* 1995; 57: 343-351.
34. Weber KSC, York MR, Springer TA, Klickstein LB. Characterization of lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)-deficient T cell lines. *J Immunol* 1997; 158: 273-279.
35. Tahiliani PD, Singh L, Auer KL, LaFlamme SE. The role of conserved amino acid motifs within the integrin  $\beta 3$  cytoplasmic domain in triggering focal adhesion kinase phosphorylation. *J Biol Chem* 1997; 272(12): 7892-7898.
36. Schoub BD. The AIDS virus. In *AIDS & HIV in Perspective*. 1994 Cambridge pp 43-69.
37. Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 1997; 89: 263-267.
38. Bates P. Chemokine receptors and HIV-1: an attractive pair? *Cell* 1996; 86: 1-3.
39. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. CC CKR5: a RANTES, MIP-1  $\alpha$ , MIP-1  $\beta$  receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996; 272: 1955-1958.
40. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. The  $\beta$ -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996; 85: 1135-1148.
41. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86: 367-377.
42. Weiss RA. HIV receptors and the pathogenesis of AIDS. *Science* 1996; 272: 1885-1886.
43. Gowda SD, Stein BS, Mohaghehpour N, Benike CJ, Engleman EG. Evidence that T cell activation is required for HIV-1 entry in CD4+ lymphocytes. *J Immunol* 1989; 142: 773-780.
44. Roederer M, Raju PA, Mitra DK, Herzenberg LA, Herzenberg LA. HIV does not replicate in naive CD4 T cells stimulated with CD3/CD28. *J Clin Invest* 1997; 99(7): 1555-1564.
45. Farnet CM, Bushman FD. HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG (Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell* 1997; 88: 483-492.
46. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993; 362: 355-358.
47. McElrath MJ, Pruetz JE, Cohn ZA. Mononuclear phagocytes of blood and bone marrow: Comparative roles as viral reservoirs in human immunodeficiency virus type 1 infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 675-679.
48. Hildreth JEK, Orentas RJ. Involvement of a leukocyte adhesion receptor (LFA-1) in HIV-induced syncytium formation. *Science* 1989; 244: 1075-1078.
49. Pantaleo G, Butini L, Graziosi C, Poli G, Schnittman SM, Greenhouse JJ, Gallin JI, Fauci AS. Human immunodeficiency virus (HIV) infection in CD4+ T lymphocytes genetically deficient in LFA-1: LFA-1 is required for HIV-mediated cell fusion but not for viral transmission. *J Exp Med* 1991; 173: 511-514.
50. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emami EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, Saag MS, Shaw GM. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995; 373: 117-122.
51. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373: 123-126.
52. Zamburo G, Gianneti A, Bertazzoni U, Girolomoni G, Langerhans cells and HIV infection. *Immunol Today* 1995; 16(11): 520-523.
53. Pope M, Betjes MGH, Romani N, Hirmand H, Cameron PU, Hoffman L, Gezelter S, Schuler G, Steinman RM. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* 1994; 78: 389-398.
54. Sylwester A, Shutt D, Wessels D, Stapleton JT, Stites J, Kennedy RC, Soll DR. T cells and HIV-induced T cell syncytia exhibit the same motility cycle. *J Leuk Biol* 1995; 57: 643-650.
55. Sylwester A, Murphy S, Shutt D, Soll DR. HIV-induced T cell syncytia are self-perpetuating and the primary cause of T cell Death in Culture. *J Immunol* 1997; 158: 3996-4007.
56. Valentin A, Lundin K, Patarroyo M, Asjö. The leukocyte adhesion glycoprotein CD18 participates in HIV-1-induced syncytia formation in monocytoid and T cells. *J Immunol* 1990; 144: 934-937.
57. Ohta H, Tsurudome M, Matsumura H, Koga Y, Morikawa S, Kawano M, Kusugawa S, Kameda H, Nishio M, Ito Y. Molecular and biological characterization of fusion regulatory proteins (FRPs): anti-FRP mAbs induced HIV-mediated cell fusion via an integrin system. *The EMBO J* 1994; 13(9): 2044-2055.
58. Weeks BS, Klotman ME, Dhawan S, Kibbey M, Rappaport J, Kleinman HK, Yamada KM, Klotman PE. HIV-1 infection of human T lymphocytes results in enhanced  $\alpha 5 \beta 1$  integrin expression. *J Cell Biol* 1991; 114(4): 847-853.
59. Ng TTC, Guintermann C, Nye KE, Parkin JM, Anderson J, Norman JE, Morrow JW. Adhesion co-receptor expression and intracellular signaling in HIV disease: implications for immunotherapy. *AIDS* 1995; 9: 337-343.
60. Dhawan S, Vargo M, Meltzer MS. Interactions between HIV-infected monocytes and the extracellular matrix: increased capacity of HIV-infected monocytes to adhere to and spread on extracellular matrix associated with changes in extent of virus replication and cytopathic effects in infected cells. *J Leuk Biol* 1992; 52: 62-69.
61. Dhawan S, Weeks BS, Soderland C, Schnaper HW, Toro LA, Asthana SP, Hewlett IK, Stetler-Stevenson WG, Yamada SS, Yamada KM, Meltzer MS. HIV-infection alters monocyte interactions with human microvascular endothelial cells. *J Immunol* 1995; 154: 422-432.
62. Shrikant P, Benos DJ, Tang LP, Benveniste EN. HIV glycoprotein 120 enhances intercellular adhesion molecule-1 gene expression in glial cells. *J Immunol* 1996; 156: 1307-1314.
63. Lafrenie RM, Wahl LM, Epstein JS, Hewlett IK, Yamada KM, Dhawan S. HIV-tat modulates the function of monocytes and alters their interactions with microvessels endothelial cells. A mechanism of HIV pathogenesis. *J Immunol* 1996; 156: 1638-1645.
64. Ma M, Nath A. Molecular determinants for cellular uptake of Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 in brain cells. *J Virol* 1997; 71: 2495-2499.
65. Cornaglia-Ferraris P, De Maria A, Cirillo C, Cara A, Alessandri G. Adhesion of human neuroblasts to HIV-1 tat. *Pediatr Res* 1995; 38: 792-796.
66. Barillari G, Gendelman R, Gallo RC, Ensoli B. The tat protein of human immunodeficiency virus type 1, a growth factor for AIDS Kaposi sarcoma and cytokine-activated vascular cells, induces adhesion of the same cell types by using integrin receptor recognizing the RGD amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7941-7945.
67. Denis M. Tat protein from HIV-1 binds to *Mycobacterium avium* via a bacterial integrin. Effects on extracellular and intracellular growth. *J Immunol* 1994; 153: 2072-2081.
68. Anderson EC, Christensen JP, Marker O, Thomsen AR. Changes in cell adhesion molecule expression on T cells associated with systemic virus infection. *J Immunol* 1994; 152: 1237-1245.
69. Albini A, Barillari G, Benelli R, Gallo RC, Ensoli B. Angiogenic properties of human immunodeficiency virus type 1 tat protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4838-4842.
70. Vogel BE, Lee S-J, Hildebrand A, Craig W, Pierchbacher MD, Wong-Staal F, Ruoslahti E. A novel integrin specificity exemplified binding of the  $\alpha 5 \beta 5$  integrin to the basic domain of the HIV tat protein and vitronectin. *J Cell Biol* 1993; 121(2): 461-468.

# Integrins: their role in ligand recognition and cell activation in human immunodeficiency virus type 1 infection

70. Faris M, Ensoli B, Stahl N, Yancopoulos G, Nguyen A, Wang S, Nel AE. Differential activation of the extracellular signal-regulated kinase, jun kinase and janus kinase-stat pathways by oncostatin M and basic fibroblast growth factor in AIDS-derived Kaposi's sarcoma cells. *AIDS* 1996; 10: 369-378.
71. Zauli G, Catani L, Gibellini D, Re MC, Milani D, Borgatti P, Bassini A, La Placa M, Capitani S. The CD4 receptor plays essential but distinct roles in HIV-1 infection and induction of apoptosis in primary bone marrow GPIIb/IIIa+ megakaryocytes and the HEL cell line. *Br J Haematol* 1995; 91: 290-298.
72. Zauli G, Catani L, Gibellini D, Re MC, Vianelli N, Colangeli V, Celeghini C, Cañitani S, La Placa M. Impaired survival of bone marrow GP IIb/IIIa megakaryocytic cells as an additional pathogenic mechanism of HIV-1-related thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1996; 92: 71-717.
73. Shi B, De Girolami U, He J, Wang S, Lorenzo A, Busciglio J, Gabuzda D. Apoptosis induced by HIV-1 infection of the central nervous system. *J Clin Invest* 1996; 98(9): 1979-1990.
74. Cottrez F, Manca F, Dalgleish AG, Arenzana-Seisdedos F, Capron A. Priming of human CD4+ antigen-specific T cells to undergo apoptosis by HIV-infected monocytes. *J Clin Invest* 1997; 99(2): 257-266.
75. Ng TTC, Kanner SB, Humphries MJ, Wickremasinghe RG, Nye KE, Anderson J, Khoo SH, Morrow JW. The integrin-triggered rescue of lymphocyte apoptosis is blocked in HIV-1-infected individuals. *J Immunol* 1997; 158: 2984-2999.
76. Ruegg CL, Strand M. Inhibition of protein kinase C and anti-CD3-induced Ca<sup>2+</sup> influx in Jurkat T cells by a synthetic peptide with sequence identity to HIV-1 gp41. *J Immunol* 1990; 144: 3928-3935.
77. Ruegg CL, Strand M. A synthetic peptide with sequence identity to the transmembrane protein gp41 of HIV-1 inhibits distinct lymphocyte activation pathways dependent on protein kinase C and intracellular calcium influx. *Cell Immunol* 1991; 137: 1-13.
78. Silvestris F, Williams, Jr RC, Dammacco F. Autoreactivity in HIV-infection: the role of molecular mimicry. *Clinical Immunol Immunopathol* 1995; 75(3): 197-205.
79. Dalgleish AG. Autoimmune mechanisms of depletion of CD4 cells in HIV infection. *Br J Haematol* 1995; 91: 525-534.
80. Oldstone MBA. Principles of viral pathogenesis. *Cell* 1996; 87: 799-801.
81. Ditzel HJ, Barbas SM, Barbas III CJ, Burton DR. The nature of the autoimmune antibody repertoire in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 1994; 91: 3710-3714.
82. Karpatkin S, Nardi MA, Hymes KB. Sequestration of anti-platelet GPIIIa antibody in rheumatoid factor immune complexes of human immunodeficiency virus 1 thrombocytopenic patients. *Immunology* 1995; 92: 2263-2267.
83. Kaplan C, Morel-Kopp MC, Kiemy MP, Kolbe H, Salmon D, Sicard D, Pialoux G, Meignier B, Excler JL, Plotkin S. Antiplatelet antibodies during the course of HIV-preventive vaccine trial. *AIDS* 1996; 10(4): 447-449.
84. Bettaieb A, Oksenhendler E, Fromont P, Duedari N, Bierling P. Immunochemical analysis of platelet autoantibodies in HIV-related thrombocytopenic purpura: a study of 68 patients (see comments). *Br J Haematol* 1989; 73: 241-7.
85. Bettaieb A, Fromont P, Lquache F, Oksenhendler E, Vainchenker W, Duedari N, Bierling P. Presence of cross-reactive antibody between human immunodeficiency virus (HIV) and platelet glycoproteins in HIV-related immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 1992; 80(1): 162-169.
86. Domínguez V, Gevorkian G, Govezensky T, Macotela Y, Viveros M, Cocho G, Masso F, Pacíneco M, Rodríguez H, Estrada JL, Lavalle C, Larralde C. Antigenic homology of HIV-1 gp41 and human platelet gpIIIa (integrin  $\beta$ 3). *J Acquired Immune Def Syn Hum Ret* 1998; 17: 385-390.
87. Calarota S, Jansson M, Levi M, Brodilen K, Libonatti O, Wigzell H, Wahren B. Immunodominant glycoprotein 41 epitope identified by seroreactivity in HIV type 1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12(8): 705-713.

## APÉNDICE

### MARCO TEÓRICO

---

Todavía no es posible realizar un diagnóstico preciso de la PTA. Los laboratorios clínicos adolecen de la metodología necesaria para el estudio de la presencia de anticuerpos antiplaqueta. No hay una técnica que sea lo suficientemente sensible y específica que asegure la presencia de estos anticuerpos. En México es todavía peor el problema, porque algunos métodos de uso común en otros países, son demasiado caros para nuestra economía.

Por estas razones se realizó una revisión crítica de los métodos en uso, para la determinación de los anticuerpos antiplaqueta.

#### 4. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTIPLAQUETA

**Domínguez V** y Govezensky T. Metodología de laboratorio para la detección de anticuerpos plaquetarios. *En Temas de Medicina Transfusional*. Ed. Prado. México, 2000. pp 271-277.

## METODOLOGIA DE LABORATORIO PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS PLAQUETARIOS

Victoria Domínguez<sup>1,2</sup>, Tzipe Govezensky<sup>2</sup>

- 1) Banco Central de Sangre, CMN, SXXI, Instituto Mexicano del Seguro Social
- 2) Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México

Las plaquetas poseen antígenos comunes con leucocitos (HLA-I) y con eritrocitos (ABH, Lewis, Ii, y P) y un sistema de antígenos propios (HPA) que se encuentran en glucoproteínas de la membrana plaquetaria. Estos últimos son los principales antígenos involucrados en la formación de autoanticuerpos y aloanticuerpos responsables en la destrucción plaquetaria en la púrpura trombocitopénica autoinmune, lupus eritematoso sistémico, púrpura neonatal y púrpura post-transfusional (1,2).

Para el estudio de anticuerpos unidos a la membrana de las plaquetas se intentó usar métodos similares a los usados en la detección de anticuerpos unidos a eritrocitos. De esta forma los primeros estudios usaron plaquetas de los pacientes (métodos directos), que una vez lavadas se hacían reaccionar con anticuerpos anti-IgG humana marcados con fluorocromos (inmunofluorescencia), con radioisótopos (inmunoradiométrico, IRMA) o con enzimas (ELISA). Y el suero de los pacientes era incubado con plaquetas normales y después de lavarlas se trataban de la misma forma antes descrita (métodos indirectos). Estos métodos resultaron complicados por dificultades técnicas en el manejo de las plaquetas en el laboratorio. Las plaquetas tienen receptores de inmunoglobulinas (FcγR) en la membrana plaquetaria y los gránulos alfa contienen concentraciones de IgG similares a las plasmáticas. Además de la presencia de anticuerpos naturales, en el suero o plasma, en contra de antígenos plaquetarios (1,2). Una alternativa de esta metodología es la prueba de inmunofluorescencia en citometría de flujo, que es ligeramente más sensible que la técnica microscópica (3). Además de que éstas técnicas, también llamadas IgG asociada a plaquetas (PAIgG del inglés platelet-associated IgG) resultan inespecíficas, porque también dan resultados positivos pacientes con trombocitopenias no inmunes (4).

Por estas razones se han diseñado numerosas técnicas para la investigación de anticuerpos anti-plaqueta y todavía no existe la técnica adecuada para establecer el diagnóstico preciso de trombocitopenias inmunes (púrpura trombocitopénica autoinmune, trombocitopenia inmune mediada por drogas), púrpura aloinmune y pruebas cruzadas de compatibilidad plaquetaria.

Debido a que se ha comprobado que los complejos gplIb-IIIa y gplb-IX son los principales blancos de los anticuerpos dirigidos en contra de antígenos propios de las plaquetas (5,6), los diferentes métodos para el estudio de los anticuerpos anti-plaquetas usan estos complejos proteicos como antígenos. Entre los diferentes métodos que existen, se detallan algunos a continuación.

- a) MAIPA (del inglés *Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens*)

Este método es útil para identificar IgG's unidas a la membrana de las plaquetas.

Las plaquetas se incuban con anticuerpos monoclonales anti gplIb-IIIa o anti gplb-IX

Las plaquetas se lavan y se lisan con TBS-triton X-100 al 1%. Los sobrenadantes se diluyen y se transfieren a las placas de microtitulación previamente recubiertas con un anticuerpo anti-IgG de ratón. Después se incuban con anti-IgG humana marcada con peroxidasa o fosfatasa revelando la reacción con el sustrato específico de la enzima y después se lee la absorbancia (7).

b) AC (del inglés *Antigen-Capture assay*).

Este método es útil para identificar inmunoglobulina unidas a la membrana de las plaquetas e inmunoglobulinas del interior de las plaquetas.

Es similar al método anterior, pero a diferencia de incubar las plaquetas con anticuerpos monoclonales, éstas se incuban con los sueros de los pacientes, después se lisan con PBS-tritón X-100 al 0.5%. Posteriormente el lisado se incuba en placas de microtitulación recubiertas previamente con un anticuerpo anti-IgG de ratón, después de lavar se recubren con anticuerpos monoclonales anti-gpIIb-IIIa o anti-gpIb-IX, bloqueando con TBS-tween 0.05%-albúmina bovina 2%. Después de la incubación con los lisados plaquetarios, las placas se incuban con un anticuerpo anti-IgG humana acoplada a fosfatasa alcalina. Después se revela con el sustrato de la enzima (p-nitrofenilfosfato) y se lee la absorbancia a 405 nm (8).

c) IBA (del inglés *Immunobead Assay*).

Perlas de poliestireno se recubren con anticuerpos monoclonales anti gpIIb-IIIa o anti gpIb-IX. Después se bloquean con PBS-tween-BSA 2%. Para el estudio de anticuerpos en suero, éste se incuba con plaquetas normales. Para el estudio de los anticuerpos unidos a las plaquetas, las plaquetas de los pacientes se usan directamente. Las plaquetas se lavan y se lisan con PBS-triton X-100 al 1.0%. Los sobrenadantes se diluyen y se transfieren a las placas de microtitulación junto con las perlas. Después se incuban con anti-IgG humana marcada radiactivamente y después se lee la radiactividad (9).

d) MACA (del inglés *Modified Antigen Capture Assay*).

Placas de microtitulación se recubren con anticuerpos monoclonales anti-gpIIb-IIIa o anti gpIb-IX. Se bloquearon con PBS-tween-BSA 2%. Para el estudio de anticuerpos en suero, estos se incuban con plaquetas normales. Las plaquetas se lavan y se lisan con PBS-triton X-100 al 1.0%. Después de lavar se incuban con anti-IgG humana biotinilada y después estreptavidina biotinilada conjugada con peroxidasa. Posteriormente se agrega el sustrato (O-fenilendiamina) y finalmente se mide la absorbancia a 492nm (10).

e) ELISA (del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Los complejos gpIIb-IIIa y gpIb-IX se purifican de plaquetas y se agregan a placas de microtitulación, después de bloquear con TBS-albúmina bovina al 2%, se incuban con eluido (pH ácido) de plaquetas o con suero de los pacientes, posteriormente se incuban con un anticuerpo anti-IgG humano conjugado con biotina, y después con estreptavidina biotinilada conjugada con peroxidasa. Después de revelar la reacción con el sustrato (o-fenilendiamina) se lee la absorbancia a 450 nm (11).

f) Uso de péptidos sintéticos

Por medio de síntesis química se preparan péptidos de gpIIIa y con ellos se sensibilizan placas de microtitulación. Estas placas se incuban con eluidos de plaquetas (con éter) o sueros de los pacientes y después se agrega un anticuerpo anti-IgG humana acoplada con fosfatasa. Esta reacción se revela con el sustrato correspondiente (p-nitrofenilfosfato) y después se lee la absorbancia a 405nm (12,13).

g) Identificación de epitopos usando una biblioteca de péptidos expresados en fagos. Estos métodos usan el colifago M-13. Este fago tiene una proteína pIII que ha sido manipulada para que exprese péptidos con secuencias al azar de aminoácidos. Los sueros de los pacientes se fijan a placas de microtitulación y después se agregan los fagos. Los fagos identificados por los anticuerpos presentes en el suero son retenidos, los que no se retienen son eliminados con los lavados subsecuentes. Después de los lavados, los fagos retenidos son eluidos con pH ácido y posteriormente se amplifican en bacterias E.coli y después de purificar el ADN bacteriano se somete a secuenciación de nucleótidos para identificar la secuencia de aminoácidos que fue retenida por los anticuerpos. Una vez seleccionados los fagos se fijan a placas de microtitulación y con el suero de otros pacientes se realiza un ensayo de ELISA tradicional para identificar si en el suero de estos pacientes existen anticuerpos que puedan reaccionar con los fagos seleccionados (14-16).

#### h) Western Blot

Hace algunos años se diseñó este método, pero no se difundió su uso debido a que los sueros de personas sanas tienen anticuerpos que reaccionan con una gran cantidad de proteínas plaquetarias. Esta técnica usa un lisado de plaquetas que se somete a electroforesis y después las proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incuba con sueros de pacientes y después con un anticuerpo anti IgG humana acoplado con una enzima se revelan las bandas de proteínas que reaccionaron con los anticuerpos, agregando un sustrato específico. Si se analizan una por una las bandas no se puede distinguir entre el suero de un paciente con PTA y el de una persona sana, pero si se somete el patrón de bandas completo es posible distinguir la reactividad por medio de un discriminante cuadrático (actualmente bajo estudio).

#### Conclusiones

En vista de que entre tantos métodos todavía no existe uno que pueda usarse para certificar el diagnóstico exacto de las trombocitopenias inmunes se han reportado estudios que comparan la efectividad de estos métodos (4, 18-20)

Kelton (4) comparó los métodos PAIgG en trombocitopenias inmunes y no inmunes y llegó a la conclusión de que estos eran métodos inespecíficos, con la información con la que se cuenta actualmente tal vez lo que ocurre es que realmente las trombocitopenias no inmunes no están bien clasificadas y también tienen un componente inmune además de otras causas.

Souberbielle (17) se pregunta en el sentido contrario. Duda si la trombocitopenia autoinmune debe ser clasificada como tal, debido a la presencia de anticuerpos en el suero de personas sanas que

reconocen las mismas proteínas que los pacientes con PTA. En este caso puede ser que el desbalance del sistema inmunológico no es únicamente por la presencia de determinados anticuerpos, también puede ser que la red de diversas especificidades es la que se encuentra alterada, conduciendo a un desequilibrio en la función de los anticuerpos.

Stockelberg (18) concluye que ninguno de los tres métodos que comparó (citometría de flujo, MACE y ELISA con plaquetas completas) fue óptimo para la detección de anticuerpos en el suero de los pacientes ya que solamente el 30% de los pacientes con PTA pueden ser diagnosticados usando las técnicas por separado. Pero que deben usarse los tres métodos para poder darles valor diagnóstico.

Berchtold y col. (19) en un estudio internacional usando los métodos MAIPA, IBA y MACA concluyen que hay buena correlación de resultados cuando se estudian los anticuerpos unidos a las plaquetas (89.5% de promedio en el coeficiente de variación, rango de 11.1-272.9%), pero que los resultados de los sueros (46.5% de promedio del coeficiente de variación, rango de 21.0-78.0%) muestran poca concordancia.

Warner y col (20) comparando el método IRMA para PAIgG con dos métodos específicos para proteínas plaquetarias (MAIPA y AC) concluyen que éstos últimos si pueden diferenciar trombocitopenias inmunes de no inmunes, pero el primero no. La sensibilidad y especificidad para cada método es de 78% y 19% para IRMA, 39% y 91% para AC y 39% y 91% para MAIPA respectivamente. Resultados que en realidad siguen siendo poco sensibles. Además la concordancia entre los métodos entre los tres métodos es de 32.6%. Es decir hasta el año de 1999, en que se publica este estudio, todavía no se ha logrado que una sola técnica sea capaz de resolver el problema en la identificación de los anticuerpos.

En cuanto a la presencia de anticuerpos producidos por aloinmunización por transfusión de plaquetas el problema también es difícil de resolver. No se encuentra correlación entre los resultados de la presencia de anticuerpos con las técnicas descritas y la destrucción de las plaquetas transfundidas (21).

Por lo anteriormente expuesto, se puede discernir que la falta de una prueba diagnóstica única para la PTA se debe a la complejidad a nivel bioquímico y biológico del fenómeno involucrado. Siendo la mejor alternativa, a la fecha, basar el criterio diagnóstico en varias pruebas para asegurar un mejor diagnóstico.

#### Bibliografía

- 1) **Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M.** Immunology of leucocytes, platelets and plasma components. In Blood Transfusion in Clinical Medicine 10<sup>th</sup> ed. Blackwell Science Ltd. 1997 pp 445-458
- 2) **George JN.** Detection of drug-dependent, autoimmune, and alloimmune antiplatelet antibodies. In Williams Hematology 5<sup>th</sup> ed. McGraw Hill, Ltd. 1995 pp L122-L124

- 3) **Visentin GP, Wolfmeyer K, Newman PJ, Aster RH.** Detection of drug-dependent platelet-reactive antibodies by antigen-capture ELISA and flow cytometry. *Transfusion* 1990;30:694-699
- 4) **Kelton J, Murphy W, Lucarely A, Garvey-Williams J, Santos A, Meyer R, Powers P.** A prospective comparison of four techniques for measuring platelet-associated IgG. *Br J Haematol* 1989;71:97-105
- 5) **Woods VL, Oh EH, Mason D, McMillan R.** Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic ITP. *Blood* 1984;63:368-375
- 6) **Kiefel V, Santoso S, Kaufmann E, Mueller-Eckhardt C.** Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib/IX: a frequent finding in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1991;79:256-262
- 7) **Kiefel V, Santosos S, Mueller-Eckardt C.** Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood* 1987;70:1722-1726
- 8) **Furihata K, Nugent DJ, Bissonette A, Aster RH, Kunicki TJ.** On the association of the platelet specific alloantigen Pen<sup>a</sup> with glycoprotein IIIa: evidence for heterogeneity of glycoprotein IIIa. *J Clin Invest* 1987;80:1624-1630
- 9) **McMillan R, Tani P, Millard F, Berchtold P, Renshaw L, Woods VL.** Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood* 1987;70:1040-1045
- 10) **Fujisawa K, Tani P, O'Toole TE, Ginsberg MH, McMillan R.** Different specificities of platelet-associated and plasma autoantibodies to platelet GPIIb-IIIa in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 1992;79:1441-1446
- 11) **Hurlimann-Forster M, Steiner B, von Felten A.** Quantitation of platelet-specific autoantibodies in platelet eluates of ITP patients measured by a novel ELISA using the purified glycoprotein complexes GPIIb/IIIa and GPIb/IX as antigens. *Br J Haematol* 1997;98:328-335
- 12) **Fujisawa K, O'Toole TE, Tani P, Loftus JC, Plow EF, Ginsberg MH, McMillan R.** Autoantibodies to the presumptive cytoplasmic domain of platelet glycoprotein IIIa in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 1991;77:2207-2213
- 13) **Domínguez V.** Relevancia de péptidos antigénicos de la glucoproteína IIIa en la púrpura trombocitopénica autoinmune. Tesis UNAM 1998
- 14) **Gevorkian G, Maoutcharian K, Almagro JC, Govezensky T, Dominguez V.** Identification of autoimmune thrombocytopenic purpura-related epitopes using phage-display peptide library. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;86:305-309
- 15) **Gevorkian G, Manoutcharian K, Govezensky T, Cano JA, Dominguez V, Santamaria H, Larralde C.** Identification of mimotopes of platelet autoantigens associated with autoimmune thrombocytopenic purpura. *J. Autoimmunity* 2000;15:33-40
- 16) **Fischer P, Jendreyko N, Hoffmann M, Lerch H, Uttenreuther-Fischer MM, Chen PP, Gaedicke G.** Platelet-reactive IgG antibodies cloned by phage display and panning with IVIG from three patients with autoimmune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1999;105: 626-640



- 17) **Souberbielle BE.** Is immune thrombocytopenic purpura (ITP) due to natural antibodies specific to platelets? *Eur J Haematol* 1996; 56:178-180
- 18) **Stockelberg D, Hou M, Jacobsson S, Kutti J, Wadenvik H.** Detection of platelet antibodies in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). A comparative study using flow cytometry, a whole platelet ELISA, and an antigen capture ELISA. *Eur J Haematol* 1996;56:72-77
- 19) **Berchtold P, Muller D, Beardsley D, Fujisawa K, Kaplan C, Kekomaki R, Lipp E, Morell-Kopp MC, Kiefel V, McMillan R, von Dem Borne AEG, Imbach P.** International study to compare antigen-specific methods used for the measurement of antiplatelet autoantibodies. *Br J Haematol* 1997;96:477-483
- 20) **Warner MN, Moore JC, Warkentin TE, Santos AV, Kelton JG.** A prospective study of protein-specific assays used to investigate idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1999;104:442-447
- 21) **Levin MD, De Vries W, De Veld J, Doekharan D, van der Holt B, van't Veer MB.** Platelet-bound immunoglobulins before and after platelet transfusion: measurement of *in vivo* binding. *Br J Haematol* 1999;104:397-402

## BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

---

1. Alves-Rosa F, Stanganelli C, Cabrera J, van Rooijen N, Palermo MS, Isturiz MA. Treatment with liposome-encapsulated clodronate as a new strategic approach in the management of immune thrombocytopenic purpura in a mouse model. *Blood* 2000;96:2834-40.
2. Ambriz R, Munoz R, Pizzuto J, Quintanar E, Morales M, Aviles A. Low-dose autologous in vitro opsonized erythrocytes. Radioimmune method and autologous opsonized erythrocytes for refractory autoimmune thrombocytopenic purpura in adults. *Arch Intern Med.* 1987;147:105-8.
3. **Domínguez V** y Ambriz R. Bioquímica y fisiología plaquetaria. *Revista de Hematología* 2001; 2: 117-27. Artículo de revisión.
4. **Domínguez V** y Govezensky T. Metodología de laboratorio para la detección de anticuerpos plaquetarios. En: Temas de Medicina Transfusional. Ed. Prado. México, 2000; p271-7.
5. **Domínguez V** y Rodríguez H. Mecanismos celulares y bioquímicos involucrados en la fisiopatogenia de la púrpura trombocitopénica autoinmune. *Gaceta Médica de México* 2002; 138: 461-72. Artículo de revisión.
6. **Domínguez V** y Rosales C. Integrins: their role in ligand recognition and cell activation in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Revista de Hematología* 2001; 2: 46-54. Artículo de revisión.
7. **Domínguez V**, Gevorkian G, Govezensky T, Rodríguez H, Viveros M, Cocho G, Macotella Y, Maso F, Pacheco M, Estrada JL, Lavalle C, Larralde C. Antigenic Homology of HIV-1 GP41 and Human Platelet Glycoprotein GPIIIa (Integrin  $\beta$ 3). *J Aq Immune Def Syn Hum Retrovir.* 1998(b);17:385-90.
8. **Domínguez V**, Govezensky T, Gevorkian G, Larralde C. Low platelet counts alone do not cause bleeding in an experimental immune thrombocytopenic purpura in mice. *Haematologica* 2003; 88: 679-87.
9. **Domínguez V**. Relevancia de péptidos antigénicos de la glucoproteína IIIa en la púrpura trombocitopénica autoinmune. *Tesis. UNAM.* México, 1998.
10. Frederiksen H, Schmidt K, The incidence of idiopathic purpura in adults increase with age. *Blood* 1999;94:909-13.

11. Fujisawa K, Tani P, O'Toole TE, Ginsberg MH, McMillan R. Different species of platelet-associated and plasma autoantibodies to platelet GPIIb-IIIa in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 1992;79:1441-6.
12. George JN, Woolf SH, Raskob GE, Wasser JS, Aledort LM, Ballem PJ, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 1996;88:3-40.
13. Gevorkian G, Manoutcharian K, Larralde C, Hernandez M, Almagro JC, Viveros M, Sotelo J, Garcia E, Sciutto E. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol Lett.* 1996;49:185-9.
14. Gevorkian G, Soler C, Viveros M, Padilla A, Govezensky T, Larralde C. Serologic reactivity of a synthetic peptide from human immunodeficiency virus type 1 gp41 with sera from a Mexican population. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996;3:651-3.
15. Gevorkian G, Manoutcharian K, Almagro JC, Govezensky T, **Dominguez V**. Identification of Autoimmune Thrombocytopenic Purpura-Related Epitopes Using Phage-Display Peptide Library. *Clin Immunol Immunopathol.* 1998;86:305-9.
16. Gevorkian G, Manoutcharian K, Govezensky T, Cano JA, **Dominguez V**, Santamaria H, Larralde C. Identification of Mimotopes of of Platelet Autoantigens Associated with Autoimmune Thrombocytopenic Purpura. *J Autoimmunity* 2000;15:33-40.
17. Gilliland BC. Blood cells: Autoimmune thrombocytopenia purpura. In: Rose NR, Mackay IR. Editors. *The Autoimmune Diseases*. San Diego: Academic Press;1998. p269-281.
18. Hou M, Stockelberg D, Kutti J, Wadenvik. Antibodies against platelet GPIb/IX, GPIIb/IIIa, and other platelet antigens in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol.*1995;55:307-14.
19. Ruyi H, Reid DM, Jones CE, Shulman NR. Spectrum of IgG classes, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1994;83:1024-32.
20. Shattil SJ. Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thromb Haemost.* 1999;82: 318-25
21. Shevach EM. Organ-specific Autoimmunity. In: Paul WE. Editor. *Fundamental Immunology*. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers; 1999. p1089-1121.
22. Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernandez M, Acero G, Rosas G, Lopez-Casillas F, Garfias CK, Vazquez R, Terrazas I, Sciutto E. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia*

- crassiceps and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun.* 1999;67:2522-30.
23. Warner MN, Moore JC, Warkentin TE, Santos AV, Kelton JG. A prospective study of protein-specific assays used to investigate idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 1999;104:442-7.
24. Woods VL, Oh EH, Mason D, McMillan R. Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic ITP. *Blood* 1984;63:368-75.