



SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

Instituto Mexicano del Seguro Social
Dirección de Prestaciones Médicas
Unidad de Atención Médica
Coordinación de Unidades Médicas de Alta Especialidad
UMAE Especialidades "Dr. Antonio Fraga Mouret"
Centro Médico Nacional "La Raza"
Departamento de Hematología



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina
División de Estudios de Posgrado

T E S I S

COMPARACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS ENTRE PACIENTES CON TROMBOCITOPENIA INMUNE Y CONTROLES SIN TROMBOCITOPENIA

que presenta

Alvaro Hernández Caballero

para obtener el grado de

Especialista en Hematología

Tutor: Dr. Jaime García Chávez.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Dr. Jesús Arenas Osuna
Jefe de la División de Educación en Salud
UMAE Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”
Centro Médico Nacional “La Raza”

Dr. Jaime García Chávez
Profesor Adjunto del Curso de Especialización en Hematología
UMAE Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”
Tutor

Dr. Jorge Vela Ojeda
Profesor Titular del Curso de Especialización en Hematología
Jefe del Servicio de Hematología
UMAE Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”
Centro Médico Nacional “La Raza”

AGRADECIMIENTOS

A :

Margarita

Alejandro

Familia Caballero

Dr. García Chávez

Dr. Vela Ojeda

Servicio de Hematología HE CMR

y especialmente a Abril.

Gracias por su apoyo

CONTENIDO

- I.** RESUMEN
- II.** ABSTRACT
- III.** INTRODUCCIÓN
- IV.** MATERIAL Y MÉTODO
- V.** RESULTADOS
- VI.** CONCLUSIONES
- VII.** BIBLIOGRAFÍA

I. RESUMEN

Título: Comparación de las Subpoblaciones Linfocitarias entre Pacientes con Trombocitopenia Inmune (TI) y Controles sin Trombocitopenia

Objetivo: Conocer los niveles de subpoblaciones linfocitarias en pacientes con TI y compararlos con sujetos control.

Material y Métodos: Se estudiaron pacientes con TI y controles de ambos géneros. Los pacientes fueron mayores de 16 años con criterios diagnósticos por el Grupo Internacional para TI sin tratamiento. No se incluyeron pacientes con diagnóstico de otra enfermedad autoinmune, títulos positivos de anticuerpos antinucleares, embarazo, puerperio o con otras enfermedades endocrinas y hematológicas. Los controles fueron mayores de 18 años donadores del Banco de Sangre. Pacientes y controles otorgaron consentimiento informado.

Se obtuvo sangre total para determinar niveles de plaquetas, linfocitos y células nucleadas totales. La determinación de subpoblaciones se realizó por citometría de flujo. Los datos obtenidos se compararon con prueba de Chi cuadrada y t de Student en el programa SPSS.

Resultados: Se estudiaron 28 pacientes y 58 controles. No hubo diferencias significativas entre la edad y el género de ambos grupos. Se encontró una disminución significativa en los niveles de linfocitos T CD4+, CD8+, NK, NKT y células dendríticas de pacientes con TI. Los niveles de linfocitos B no tuvieron diferencias. Las muestras de pacientes con TI mostraron tendencia a la disminución en niveles de células T reguladoras, sin ser significativa.

Conclusión: Los enfermos con TI tienen diferentes niveles de subpoblaciones linfocitarias, comparados con controles sin trombocitopenia. Esta diferencia está relacionada con la fisiopatología de la enfermedad.

Palabras Clave: Trombocitopenia Inmune, linfocitos, respuesta inmune.

ABSTRACT

Title: Comparison of Lymphocyte Populations between Patients with Immune Thrombocytopenia (IT) and Controls without Thrombocytopenia.

Goal: To measure lymphocyte populations in IT patients and compare with controls.

Methods: We studied IT patients and controls of both genders. Patients were older than 16, met IT International Group diagnostic criteria and had not treatment. Patients with another autoimmune disease, antinuclear antibodies, pregnancy, puerperium or other endocrine or hematologic disease were not included. Controls were accepted Blood Bank donors older than 18. Both patients and control gave their informed consent.

Total blood was drawn to measure platelets, lymphocytes and total nucleated cells. Flow cytometry was used to measure lymphocyte subpopulations. Data obtained were compared using Chi squared and Student t tests in SPSS program.

Results: Twenty eight patients and 58 controls were studied. There were no significant differences between age and gender in both groups. We found a significant decrease in CD4+ T cells, CD8+, NK, NKT and dendritic cells levels of IT patients. B cell levels had not differences between patients and controls. T regs levels of IT patients trend to decrease compared with controls, but this difference was no significant.

Conclusions: IT patients had differences in lymphocyte levels, compared with non-thrombocytopenic controls. Differences in lymphocyte levels are related to pathophysiology of this disease.

Key words: Immune thrombocytopenia, lymphocytes, immune response.

INTRODUCCIÓN

Definición

La trombocitopenia inmune (TI), también conocida como púrpura trombocitopénica idiopática o púrpura trombocitopénica inmune es un trastorno autoinmune adquirido ¹. Según el consenso del grupo internacional más reciente, se define por la presencia de trombocitopenia (cuenta plaquetaria menor a $100 \times 10^9/L$) en ausencia de otras causas o desórdenes que puedan estar asociados a trombocitopenia. Según este criterio, el diagnóstico de TI es de exclusión debido a que no se cuenta en la actualidad con parámetros clínicos o de laboratorio que permitan establecer el diagnóstico con certeza ².

De acuerdo al citado consenso se pueden definir diferentes fases de la enfermedad, según como se muestra en la tabla 1 ².

Tabla 1. Fases de la Trombocitopenia Inmune

Fase	Características
Diagnóstico nuevo (de novo)	Dentro de los primeros 3 meses del diagnóstico.
Persistente	Entre 3 y 12 meses del diagnóstico. Pacientes que no tuvieron remisión espontánea o que no mantuvieron la respuesta completa.
Crónica	Más de 12 meses de duración.
Grave	Síntomas hemorrágicos al diagnóstico que precisaron tratamiento o aparición de nuevos síntomas que requirieron intervención terapéutica adicional.

Epidemiología

La TI es de las enfermedades autoinmunes más frecuentes. Su epidemiología varía dependiendo la población y el grupo de edad reportado.

En niños, la incidencia reportada es de 5.8 casos/100,000 en Europa, con una prevalencia de 4.6/100,000; mientras en EUA se reporta una prevalencia mayor de 7.2/100,000 ³.

La incidencia de TI en adultos se ha reportado de 1.6 a 3.2 casos por 100,000 habitantes por año con una mediana de la edad al diagnóstico de 56 años. En cuanto al género se observa un predominio de mujeres en menores de 60 años, para equiparse la proporción entre ambos sexos en pacientes mayores a esa edad ^{1,4}.

Fisiopatología

Autoinmunidad

Todos los seres humanos tienen la posibilidad de presentar fenómenos autoinmunes, debido a que durante su desarrollo, los linfocitos pueden expresar receptores específicos para antígenos propios y muchos antígenos propios están accesibles al sistema inmune.

La tolerancia a los antígenos propios se mantiene normalmente por un proceso de selección que previene la maduración de los linfocitos específicos para antígenos propios y por mecanismos que inactivan o eliminan a los linfocitos auto-reactivos que alcanzan a madurar. La pérdida de la auto-tolerancia puede resultar de la selección o regulación anormal de linfocitos auto-reactivos o de alteraciones en la manera en la que los antígenos propios son presentados al sistema inmune.

Las células T tienen un papel importante en los fenómenos de autoinmunidad, tanto por la participación de los linfocitos T cooperadores como reguladores de las respuestas inmunes a proteínas, como por la función del complejo mayor de histocompatibilidad para presentar antígenos a las células T. Por lo anterior la falla en la auto-tolerancia resulta en enfermedades autoinmunes como la TI.

Tal como ocurre en la TI, el inicio de varias enfermedades autoinmunes se asocia con o es precedida por infecciones. Se conoce que las infecciones pueden promover el desarrollo de autoinmunidad por dos mecanismos. En el primero la presencia de algún patógeno resulta en el reclutamiento de leucocitos y la expresión de co-estimuladores que resulta en la activación de células T inespecíficas que pueden atacar a los tejidos propios. En el segundo mecanismo, los agentes infecciosos contienen antígenos que reaccionan de forma cruzada con antígenos propios, por lo que la respuesta inmune montada contra el patógeno desencadena también daño al huésped. Ambos mecanismos se han implicado en la TI⁵.

Células B

En 1951 W. Harrington desarrolló trombocitopenia transitoria tras infundirse él mismo plasma proveniente de pacientes con TI y desde entonces se sentaron las bases para proponer la participación de factores plasmáticos en el desarrollo de la enfermedad⁶.

Investigaciones posteriores permitieron explicar que la disminución de plaquetas en la TI se debe a la destrucción mediada por anticuerpos plasmáticos. Los blancos antigénicos más frecuentes para estos anticuerpos son las glicoproteínas IIb/IIIa y Ib/IX de la plaqueta; mientras cierto número de pacientes presentan anticuerpos contra múltiples antígenos plaquetarios¹.

La fagocitosis dependiente de auto-anticuerpos es el mecanismo principal de destrucción plaquetaria en la TI, siendo el bazo el órgano más importante para la producción de anticuerpos y para la eliminación de plaquetas cubiertas por IgG. Los macrófagos humanos expresan varios receptores para Fc que se unen específicamente a la IgG, siendo los receptores de baja afinidad

FcγRIIA y FcγRIIA los principales responsables de remover las plaquetas opsonizadas por el sistema reticuloendotelial ³.

Los anticuerpos contra GP IIb/IIIa muestran restricción clonal para el uso de cadenas ligeras y la secuenciación de las regiones de combinación a antígeno sugiere que se originan de un número limitado de clones de células B por una selección de afinidad al antígeno y mutación somática ⁷.

Sin embargo, es notable que hasta en un 50% de los pacientes no sea posible detectar anticuerpos anti-plaqueta y en otros se observan remisiones de la enfermedad a pesar de la persistencia de auto-anticuerpos, lo cual hace suponer la participación de otros mecanismos en la etiología de la enfermedad ⁸.

Células T

Se ha propuesto que las células T tiene un papel fisiopatogénico en la TI, estas hipótesis se originan de estudios que demuestran la necesidad de la cooperación de células T CD4+ antígeno-específicas para la producción de anticuerpos antiplaqueta por las células B. Para ser posible esta interacción se ha visto que las células T frecuentemente reconocen la porción amino terminal de las glucoproteínas IIb y IIIa y que estas moléculas también estimulan la producción de anticuerpos anti-plaquetas ⁸.

Además, se han encontrado células T reactivas contra plaquetas en la sangre de pacientes con TI y evidencia complementaria indica que los pacientes con TI crónica tienen niveles mayores de células T HLA-DR+, receptores para interleucina-2, un cociente Th1/Th2 alterado y expansión de linfocitos T oligoclonales. También se ha podido demostrar que los linfocitos T CD3+ de pacientes con TI tienen mayor expresión de genes involucrados en citotoxicidad y menor expresión de genes apoptóticos.

Otra explicación de la participación celular en la TI proviene del hecho de que pacientes en remisión experimentan un aumento en la expresión de genes KIR, este hallazgo sugiere que la sobrerregulación de KIR inhibe la citotoxicidad de linfocitos e induce la remisión ⁶.

Citocinas

Se han encontrado varias alteraciones en la producción de citocinas asociadas a la TI, principalmente relacionadas al balance de la respuesta inmune Th1/Th2. Cuando se presenta la enfermedad activa, las células tipo 1 proliferan, combinado con una reducción en el número de células Th2. A nivel sérico estos cambios se reflejan en un incremento de los niveles de IL-2, interferón gamma e IL-10. Sin embargo, cuando la TI se encuentra en remisión, este patrón se invierte con predominio de la respuesta Th2 ⁶.

Por otro lado, se ha visto que los pacientes con TI en remisión tienen niveles significativamente elevados de factor de crecimiento transformante beta, la cual actúa como citocina inmunosupresora y se considera como marcador del patrón Th3 ⁸.

Tolerancia inmune

La emergencia de anticuerpos anti-plaqueta y células T citotóxicas se deriva de la pérdida de la tolerancia inmunológica a los antígenos propios. A pesar de que la GP IIb/IIIa se expresa en el epitelio tímico desde la vida intrauterina temprana, se ha demostrado la presencia de células T auto-reactivas contra esta misma proteína en la sangre periférica de individuos sanos, por lo que se supone que la tolerancia periférica es crucial para evitar la activación de las células T auto-reactivas⁹.

En estudios previos se ha visto que las células T reguladoras CD4+ CD25+ se encuentran disminuidas en número y función en pacientes con TI, comparados con individuos sanos, explicando con ello la falta de mecanismos capaces de controlar la respuesta autoinmune¹⁰.

Producción plaquetaria

A pesar de que anteriormente se pensaba que la producción de plaquetas se encontraba aumentada en pacientes con TI para compensar la destrucción acelerada, actualmente se cuenta con evidencia de que la trombopoyesis se encuentra en realidad, disminuida. Incluso algunos estudios han descrito daño a los megacariocitos mediados por anticuerpos, citotoxicidad o citocinas, resultando en una maduración alterada de los megacariocitos⁷.

Efectos del tratamiento sobre el sistema inmune

La primera línea de tratamiento para la TI son los corticoesteroides como prednisona o metilprednisolona. Por mucho tiempo su uso fue empírico sin contar con bases farmacológicas o fisiopatológicas sólidas. Sin embargo desde varios años se ha podido explicar el efecto inmune de estos medicamentos y esto a su vez, ha podido reafirmar la participación de la inmunidad celular en esta enfermedad.

De forma interesante, se ha visto que la cuenta de células dendríticas disminuye tras la administración de prednisona en pacientes con TI y esta reducción se asocia con un incremento en la cuenta plaquetaria¹¹. Además en pacientes con artritis reumatoide, otra enfermedad autoinmune, el tratamiento con dexametasona disminuye la proliferación de linfocitos de una manera dosis dependiente¹².

Esta información se ha podido replicar con otro medicamento efectivo para tratar la TI, el uso de inmunoglobulina G. A este respecto se ha visto que las dosis elevadas de inmunoglobulina intravenosa pueden modificar el número y función de las subpoblaciones linfocitarias y específicamente los niveles de células CD4+ y esto correlaciona con la respuesta al tratamiento de inmunoglobulina¹³.

Finalmente, la regulación de la respuesta inmune humoral y celular mediante la reducción significativa de la población de linfocitos B con el anticuerpo monoclonal Rituximab ha logrado respuestas en el tratamiento de pacientes con trombocitopenia inmune crónica o refractaria a

tratamientos de primera y segunda línea. Esto indica que en la fisiopatología de la enfermedad es relevante la participación de linfocitos B como T¹⁴.

Cuadro clínico y evolución

Las manifestaciones de la TI son muy variables, pudiendo ir desde el paciente completamente asintomático hasta el que presenta hemorragia franca de cualquier sitio, siendo el evento más grave, sangrado intracraneal^{1,3}.

Algunos pacientes pueden presentar alguna infección como fenómeno desencadenante de la trombocitopenia, mientras que en otros el evento es de inicio súbito. Típicamente los síntomas hemorrágicos son de tipo mucocutáneo como petequias, equimosis y sangrado por mucosas. Los sangrados graves como gastrointestinales, respiratorios, urinarios o cerebrales resultan raros³.

Debido a que los niños con TI son manejados frecuentemente sólo con la observación, la historia natural de la enfermedad se ha podido caracterizar mejor en esta población. Una revisión retrospectiva de 409 pacientes pediátricos reportó un 100% de remisiones espontáneas en pacientes sin tratamiento, mientras otro estudio con 1496 niños incluidos reportó remisiones completas en 68%, comparado con 73% después del tratamiento con esteroides y un 66% tras recibir inmunoglobulina⁴.

En cuanto a los adultos, el porcentaje de remisiones espontáneas es mucho menor, ya que esta evolución se observa en menos del 10% de los casos. En este grupo de edad las tasas de respuesta a corticoesteroides oscilan entre un 60% y 70%, mientras la infusión de inmunoglobulina puede alcanzar respuestas del 80%. Cabe mencionar que no todos los pacientes que logran respuesta pueden conservarla, ya que a lo largo del tiempo más de la mitad de los pacientes pueden experimentar una recaída^{4,10}.

Debido a la heterogeneidad de criterios, varios autores han reportado como indicador de respuesta diferentes datos clínicos o de laboratorio.

Por lo anterior surgió la necesidad de estandarizar los criterios de respuesta para definir de forma uniforme la evolución de la enfermedad de los pacientes, tal como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Criterios de Respuesta de la Trombocitopenia Inmune².

Respuesta	Criterios
Remisión Completa	Cuenta plaquetaria mayor a $100 \times 10^9/L$ y ausencia de sangrado
Respuesta	Cuenta plaquetaria de más o igual a $30 \times 10^9/L$ o al menos un incremento de 2 veces el basal con ausencia de sangrado
Sin respuesta	Cuenta plaquetaria menor a $30 \times 10^9/L$ o incremento menor a 2 veces el basal o sangrado
Pérdida de la respuesta	Dejar de cumplir criterios de RC o R habiéndolos alcanzado

	previamente.
Dependencia a esteroide	Necesidad de dosis repetidas de corticoesteroides por al menos 2 meses para mantener una cuenta plaquetaria de $30 \times 10^9/L$ o para evitar el sangrado. Se considera como no respuesta.

JUSTIFICACIÓN

Es sabido que en la fisiopatología de la trombocitopenia inmune participan distintos grupos de células del Sistema Inmune, incluyendo células presentadoras de antígeno, células productoras de anticuerpos, células efectoras y células reguladoras. Sin embargo, aún no se ha reportado una evaluación cuantitativa completa de las distintas subpoblaciones inmunológicas en un grupo de pacientes con esta enfermedad.

La obtención de esta información permite un mejor conocimiento de los mecanismos inmunes involucrados en esta patología y como consecuencia, el diseño de terapias más efectivas para el tratamiento de los pacientes.

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue la determinación de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en pacientes con trombocitopenia inmune, comparándolas con las de individuos sin esta condición.

MATERIAL Y MÉTODO

Para el análisis se incluyeron sujetos atendidos en la Unidad Médica de Alta Especialidad “Dr. Antonio Fraga Mouret” del Centro Médico Nacional “La Raza”, IMSS, México, DF.

Los pacientes fueron hombres y mujeres mayores de 16 años que cumplieron los criterios diagnósticos del Grupo Internacional para TI², que no habían iniciado tratamiento farmacológico y otorgaron su consentimiento informado para la obtención de la muestra. Fueron criterios de no inclusión para los pacientes contar con diagnóstico de otra enfermedad autoinmune o presentar datos clínicos sugestivos de esta, títulos positivos de anticuerpos antinucleares, embarazo confirmado o bajo sospecha, puerperio inmediato o tardío y cursar con otras enfermedades del sistema endocrino o linfohemático.

En cuanto a los controles, se incluyeron hombres y mujeres mayores de 18 años, donadores aceptados del Banco Central de Sangre del Centro Médico La Raza y que otorgaron su consentimiento para la utilización de la muestra.

A todas las muestras se les realizó una biometría hemática en un analizador automático Sysmex XT 2000 (Illinois, EUA) para determinar el número de células nucleadas totales. Posteriormente, se diluyeron 1×10^6 células en 100mL de amortiguador salino de fosfatos pH 7.35 (FACS flow) y se adicionaron 20 mL de anticuerpo monoclonal marcado con un fluorocromo para después mezclar e incubar 20 min a 4°C en oscuridad. Después, se agregaron 2mL de solución de lisis de eritrocitos 1X, se mezcló e incubó por 10 min a 4°C en oscuridad; y posteriormente se centrifugó por 5 min para después decantar. Acto seguido se adicionaron 2mL de amortiguador de fosfatos para resuspender la muestra y se procedió a otra centrifugación. Al eliminar el sobrenadante, se adicionaron 0.8mL de amortiguador de fosfatos y se resuspendieron las células con un mezclador vórtex a baja velocidad. La muestra resultante se procesó en un citómetro de flujo modelo FACSCalibur de Becton Dickinson (New Jersey, EUA) utilizando el programa de Cell Quest Pro. versión 5.1.1 para obtener la cantidad de células en 20,000 eventos.

Las subpoblaciones de linfocitos de pacientes y controles se determinaron a través de marcadores monoclonales contra proteínas de membrana de acuerdo a lo siguiente:

- Linfocitos B: CD19+, CD20+
- Linfocitos T: CD3+, CD4+, CD8+
- NK CD3-, CD16 + 56 +
- Células dendríticas 1 y 2: lin 1+, HLA-DR+, CD11c+, CD123+
- Células T reguladoras: CD4+, CD25+, Foxp3+

Se obtuvieron datos demográficos de pacientes y controles incluyendo género y edad y se compararon mediante la prueba de Chi cuadrada. Para determinar si existieron diferencias significativas entre las mediciones de subpoblaciones linfocitarias de pacientes y controles se utilizó la prueba t de Student para muestras independientes de dos colas. Un valor de p menor a 0.05 fue

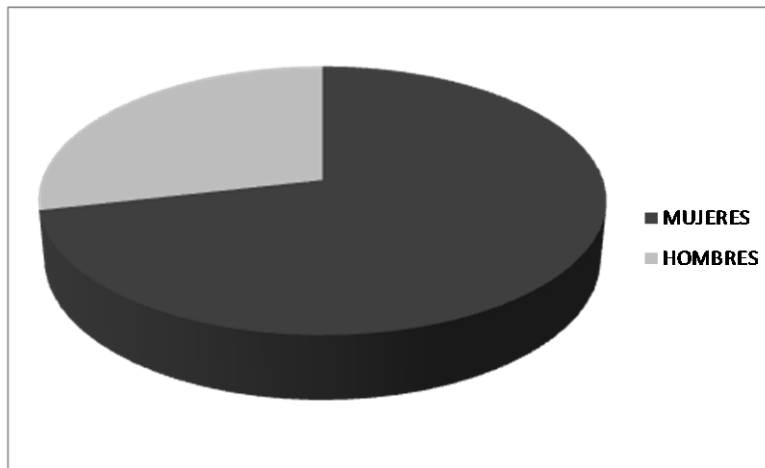
considerado significativo. Los cálculos estadísticos se realizaron en el programa SPSS versión 10.0 (Chigaco, Illinois, EUA).

Este estudio fue aprobado por el Comité Local de Investigación de la UMAE Especialidades del Centro Médico La Raza, IMSS.

RESULTADOS

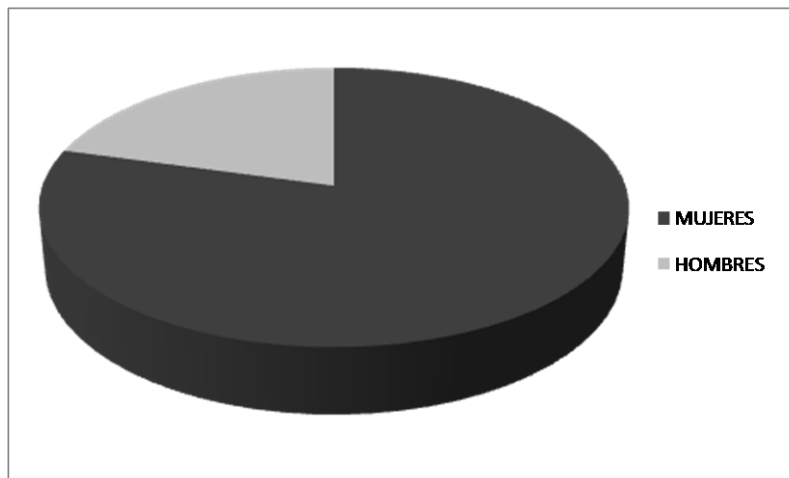
Para el estudio fueron incluidos 28 pacientes y 58 controles. La distribución por género de los pacientes con trombocitopenia inmune se muestra en el Gráfico 1.

Grafico 1. Género de pacientes con trombocitopenia inmune



La media de la edad para los pacientes fue de 46 años (rango de 31 a 57) y para los controles de 34 años (rango de 18 a 56). La distribución por género de los controles se muestra en el Gráfico 2. No se encontraron diferencias significativas entre el género o la edad de pacientes y controles.

Grafico 2. Género de controles sin trombocitopenia



En la biometría hemática de los pacientes la media de la cuenta plaquetaria fue de 25000/mL, mientras que para los controles la media fue de 225000/mL ($p < 0.05$). La media de la cuenta de linfocitos totales en los pacientes resultó de 2334/mL, siendo para los controles de 3647/mL. Se contaron 6980/mL y 7300/mL células nucleadas totales en pacientes y controles, respectivamente. No hubo diferencias significativas para los valores de linfocitos o células nucleadas totales de pacientes y controles.

En la tabla 3 se muestran los resultados de la determinación de subpoblaciones linfocitarias de pacientes con trombocitopenia inmune y controles sin trombocitopenia.

Tabla 3. Subpoblaciones linfocitarias de pacientes y controles.

CÉLULAS e6/L	PACIENTES	CONTROLES	PRUEBA t
Linfocitos B	36.57	19.27	No Significativo
Linfocitos T CD4+	150.25	920.8	$p < 0.05$
Linfocitos T CD8+	113.648	504.425	$p < 0.05$
Células NK	91.491	303.47	$p < 0.05$
Células NKT	18.26	55.86	$p < 0.05$
Células Dendríticas	20.87	9.72	$p < 0.05$
Células Reguladoras	0.3	0.49	No Significativo

DISCUSIÓN

El sistema inmune humano tiene la capacidad de diferenciar lo propio de lo ajeno, favoreciendo la producción de anticuerpos y la reproducción de células reactivas contra los agentes patógenos, al tiempo que bloquea la acción inmune contra los tejidos propios. Sin embargo, estos mecanismos no son perfectos y en algunos individuos se pueden procesar antígenos derivados de tejidos autólogos, con la subsecuente producción de auto-anticuerpos y la generación de células efectoras auto-reativas.

La pérdida de la tolerancia inmune a los tejidos propios y el daño mediado por inmunidad humoral o celular hacia estos tejidos es la fisiopatología común a las enfermedades denominadas auto-inmunes.

Dentro de las enfermedades auto-inmunes más frecuentes se encuentra la trombocitopenia inmune, en la cual existe una disminución de la cuenta plaquetaria circulante, principalmente por fagocitosis de células opsonizadas por un auto-anticuerpo⁸. La falta de correlación completa entre el comportamiento clínico de la enfermedad y el título de anticuerpos sugirió la presencia de otros mecanismos fisiopatológicos en la génesis de la trombocitopenia⁸. A partir de este conocimiento se ha podido identificar la falta de regulación de distintas subpoblaciones de linfocitos en la génesis de la destrucción inmune de las plaquetas circulantes y en la disminución de la producción de plaquetas por los megacariocitos medulares⁶.

A la fecha se han descrito modificaciones en la secreción de citocinas por los linfocitos T cooperadores o citotóxicos de pacientes con TI^{15,16}, e incluso se han detectado alteraciones funcionales en algunos tipos celulares específicos^{17,18}; sin embargo, en nuestro conocimiento no existen publicaciones que reporten de forma completa los niveles de los diferentes subtipos de células con función inmune en pacientes con TI. Es por ello que el objetivo de esta tesis fue la caracterización de las poblaciones de células B, T, NK, NKT, dendríticas y reguladoras en pacientes con TI y compararlas con las de controles sin trombocitopenia.

Debido a que no se cuenta con información previa sobre este fenómeno biológico, no se realizó un cálculo formal del tamaño de muestra necesario para observar diferencias significativas, en cambio se realizó un muestreo a conveniencia, incluyendo un total de 28 pacientes y 58 controles, con la finalidad de incluir al menos 2 controles por cada caso. En cuanto a la edad y género no se observaron diferencias significativas, lo cual disminuye la posibilidad de incluir variables extrañas al análisis o que las diferencias en los parámetros medidos se debieran a desigualdad intrínseca entre los grupos.

La cuenta de plaquetas en la biometría hemática de pacientes y controles fue significativamente diferente, de acuerdo a lo esperado con una menor concentración en los afectados de TI. Con respecto a la cuenta de linfocitos totales, la TI se comporta como otras enfermedades autoinmunes como el Lupus Eritematoso Sistémico, presentando una linfopenia absoluta de leve a moderada¹⁹, siendo esto observado en los pacientes de la presente investigación, esta diferencia no alcanzó significancia estadística al ser comparada con los controles y que a su vez, se refleja en la cuenta de células nucleadas totales.

En un artículo publicado por Mylvaganam y colaboradores en 1988 se utilizaron anticuerpos monoclonales contra linfocitos T y B para describir las propiedades funcionales de estas células en la fase activa de la TI y durante el tratamiento con anabólicos como el danazol. A pesar de que el objetivo central del artículo fue evaluar la respuesta de linfocitos cultivados al ser expuestos a

mitógenos, los autores también midieron las proporciones de linfocitos con con fenotipo pan-T (T3), T inductor/cooperador (T4), T supresor/citotóxico (T8) y Pan-B (B4) en pacientes con TI activa y controles. Al igual que los resultados encontrados en esta investigación, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de linfocitos con marcadores Pan-B; tomando en cuenta que la principal causa de la destrucción plaquetaria en esta enfermedad es mediada por anticuerpos, llama la atención que no se observen diferencias en las poblaciones de linfocitos B. Sin embargo, esto puede deberse a que las células encargadas de la producción de anticuerpos en su mayoría corresponden a células B maduras que se han diferenciado a células plasmáticas, si bien existe una pequeña proporción de células plasmáticas productoras de anticuerpos que preservan en su membrana la expresión de marcadores pan-B, la mayoría de estas se identifican en la citometría de flujo por marcadores más específicos como CD38+ o CD138+ e incluso se puede considerar como un indicador de la malignidad la expresión aberrante de un marcador pan-B como CD19+ en células de mieloma ²⁰. Otra posible explicación a la ausencia de diferencias en el número de células B circulantes entre enfermos con TI y controles reside en que la producción de estas células se encuentre normal, pero que la alteración resida en su activación incrementada por otros tipos celulares como linfocitos T.

Precisamente, los resultados de Mylvaganam y colaboradores coinciden con este trabajo en reportar diferencias significativas en la concentración de linfocitos T, ya sea con marcadores pan-T como CD3+, del tipo cooperador (CD4) o citotóxico (CD8) ¹⁷, con una disminución en el grupo de sujetos enfermos. Esta alteración no solo fue de tipo cuantitativo, sino que además pudieron demostrar alteraciones funcionales, principalmente al exponer las células T a un estímulo blastogénico. Incluso los autores concluyen que la TI se debe a una disfunción de células T independiente de factores humorales dependientes de células B. Una explicación a este fenómeno la plantean Chang-Lin y colaboradores, al demostrar que los pacientes con TI tienen linfocitos con predisposición a la apoptosis, ya que tienen una expresión diferente de proteínas como FAS, FASL, BCL2 y BAX. Además, la expresión de proteínas apoptóticas estuvo relacionada a la activación de los linfocitos cooperadores ²¹ y citotóxicos, apoyando la disminución observada en el grupo de pacientes ²².

Otra posible causa de la disminución de subpoblaciones de linfocitos T en la sangre periférica de pacientes con TI puede provenir de los hallazgos del grupo de Olsson en 2008 ²³. En el trabajo citado, se midió la expresión de marcadores como VLA-4 y CX3CR1, ambos involucrados en el reclutamiento de células T a médula ósea. Los autores encontraron que estas proteínas se encontraban elevadas en la sangre de pacientes con TI y pudieron demostrar por inmunohistoquímica un incremento en el número de células T medulares, mas no en la periferia. Se piensa que la expresión de estas proteínas pueda estar relacionada con un reclutamiento de células efectoras a tejidos importantes para la destrucción plaquetaria, por lo que es factible que se observe el mismo fenómeno en tejido esplénico o hepático. Por consiguiente, la migración de células T a otros tejidos, necesariamente involucra una disminución de sus niveles en la sangre de sujetos con TI, tal como se reporta en este trabajo.

En la Tabla 3 se puede observar que los niveles de células *natural killer* (NK) y NKT también se encuentran disminuidos significativamente. A este respecto, se ha propuesto que estas células puedan estar involucradas en la citotoxicidad directa contra los megacariocitos de pacientes con TI. Diversos estudios han sugerido que la disminución de las plaquetas en los pacientes con TI no sólo se debe a destrucción periférica por el sistema retículo-endotelial, sino que además los

megacariocitos pueden estar disminuidos en número y función, afectando la producción plaquetaria desde la médula ósea ¹. Ya que la toxicidad medular se debe a la acción de las células NK y NKT ²⁴, se podría observar un efecto de reclutamiento similar al de las células T antes expuesto. Esta puede ser la causa de observar una disminución de estas células en la sangre periférica de pacientes con TI. En la literatura revisada para este trabajo no se encontró algún otro estudio que reportara niveles de células NK en esta enfermedad.

Recientemente ha surgido un interés especial en las células reguladoras, ya que sus efectos directos e indirectos pueden inducir supresión de la respuesta inmune celular y humoral controlando la magnitud y la duración de las reacciones aloinmunes y autoinmunes. Estas células se pueden identificar por un patrón fenotípico específico a través de los marcadores CD4+, CD25+, Foxp3+. Múltiples estudios en diversas enfermedades con etiología inmune han implicado alteraciones cuantitativas o cualitativas de estas células en la fisiopatología e incluso como blanco terapéutico. En el caso de la TI algunos trabajos iniciales habían reportado una disminución del ARNm y la proteína FoxP3 en células T reguladoras de pacientes con TI. A partir de esta información, Yu y colaboradores publicaron en 2008 los niveles y función de estas células en 17 pacientes con TI. De manera relevante, el presente trabajo pudo replicar en una población mayor lo observado previamente, una tendencia a la disminución de células Treg en pacientes con TI pero sin alcanzar significancia estadística. A través de estudios funcionales, Yu y cols. sugirieron que es una disminución en la función y no en el número la principal participación de esta subpoblación linfocitaria a la génesis de la TI.

Probablemente el incrementar el número de sujetos en ambas poblaciones pueda ayudar a diferenciar si esta tendencia es significativa o no.

CONCLUSIONES

La TI se encuentra dentro de las enfermedades auto-inmunes más frecuentes, afectando a población pediátrica y adulta de ambos sexos.

En su fisiopatología participan mecanismos inmunes de tipo humoral, así como alteraciones en el número o la función de varios subtipos celulares.

El presente estudio comparó subpoblaciones de linfocitos en pacientes adultos con trombocitopenia inmune de reciente diagnóstico con las de controles sin trombocitopenia.

Se observó una disminución significativa en los niveles de linfocitos TCD4+, TCD8+, NK, NKT y células dendríticas. No se observaron diferencias significativas en los niveles de linfocitos B y existe una tendencia a la disminución de células T reguladoras en el grupo de pacientes, pero sin alcanzar significancia estadística.

Los pacientes presentaron diferencia en los niveles de las subpoblaciones linfocitarias en comparación con los controles. Estas diferencias pueden explicar parte de la fisiopatología de la TI.

Se requieren estudios con una población mayor y análisis funcionales para explicar mejor la participación de estas subpoblaciones en el origen de la TI.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stasi R, Evangelista ML, Stipa E, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management. *Thromb. Haemost.* 2008;99(1):4-13.
2. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood.* 2009;113(11):2386-2393.
3. Psaila B, Bussel JB. Immune thrombocytopenic purpura. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2007;21(4):743-759, vii.
4. Fogarty PF, Segal JB. The epidemiology of immune thrombocytopenic purpura. *Curr. Opin. Hematol.* 2007;14(5):515-519.
5. Lichtman A. Cellular and molecular immunology. *Saunders.* 2003.
6. Chong BH. Primary immune thrombocytopenia: understanding pathogenesis is the key to better treatments. *J. Thromb. Haemost.* 2009;7(2):319-321.
7. Cines DB, McMillan R. Pathogenesis of chronic immune thrombocytopenic purpura. *Curr. Opin. Hematol.* 2007;14(5):511-514.
8. Semple JW. Pathogenic T-cell responses in patients with autoimmune thrombocytopenic purpura. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2003;25 Suppl 1:S11-13.
9. Cooper N, Bussel J. The pathogenesis of immune thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* 2006;133(4):364-374.
10. Cines DB, Bussel JB, Liebman HA, Luning Prak ET. The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. *Blood.* 2009;113(26):6511-6521.
11. Hsu NC, Chung C, Horng H, Chang C. Corticosteroid administration depresses circulating dendritic cells in ITP patients. *Platelets.* 2004;15(7):451-454.
12. De A, Blotta HM, Mamoni RL, et al. Effects of dexamethasone on lymphocyte proliferation and cytokine production in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2002;29(1):46-51.
13. Macey MG, Newland AC. CD4 and CD8 subpopulation changes during high dose intravenous immunoglobulin treatment. *Br. J. Haematol.* 1990;76(4):513-520.
14. Garcia-Chavez J, Majluf-Cruz A, Montiel-Cervantes L, Esparza MG, Vela-Ojeda J. Rituximab therapy for chronic and refractory immune thrombocytopenic purpura: a long-term follow-up analysis. *Ann. Hematol.* 2007;86(12):871-877.
15. Ma D, Zhu X, Zhao P, et al. Profile of Th17 cytokines (IL-17, TGF-beta, IL-6) and Th1 cytokine (IFN-gamma) in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Ann. Hematol.* 2008;87(11):899-904.
16. Ogawara H, Handa H, Morita K, et al. High Th1/Th2 ratio in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur. J. Haematol.* 2003;71(4):283-288.

17. Mylvaganam R, Garcia RO, Ahn YS, et al. Depressed functional and phenotypic properties of T but not B lymphocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 1988;71(5):1455-1460.
18. Yu J, Heck S, Patel V, et al. Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2008;112(4):1325-1328.
19. Greer, J. Forester, J. Lukens, J. Wintrobe's Clinical Hematology. *Lippincott Williams and Wilkins*. 2003;11 ed.
20. Rawstron AC. Immunophenotyping of plasma cells. *Curr Protoc Cytom*. 2006;Chapter 6:Unit6.23.
21. Semple JW, Freedman J. Increased antiplatelet T helper lymphocyte reactivity in patients with autoimmune thrombocytopenia. *Blood*. 1991;78(10):2619-2625.
22. Chang-Lin WU, Jian-Cheng XUE, Fang LIU, et al. Polarization and apoptosis of T cell subsets in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Int J Lab Hematol*. 2007;29(3):177-184.
23. Olsson B, Ridell B, Carlsson L, Jacobsson S, Wadenvik H. Recruitment of T cells into bone marrow of ITP patients possibly due to elevated expression of VLA-4 and CX3CR1. *Blood*. 2008;112(4):1078-1084.
24. Zhang J, Ma D, Zhu X, et al. Elevated profile of Th17, Th1 and Tc1 cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica*. 2009;94(9):1326-1329.

ANEXOS

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Folio:

Paciente

Control

Fecha:

Nombre del sujeto:

Número de Afiliación:

Género:

Edad:

Datos clínicos al diagnóstico:

Plaquetas al diagnóstico:

Fecha de toma de muestra:

Celularidad de la muestra:

Células nucleadas totales:

Porcentaje de células CD19+, CD20+:

Porcentaje de células CD3+, CD4+, CD8+:

Porcentaje de células CD3-, CD16 + CD56+ :

Porcentaje de células lin 1+, HLA-DR+, CD11c+, CD123+:

Porcentaje de células CD4+, CD25+, Foxp3+:

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Lugar y Fecha:

Por medio de la presente deseo participar en el protocolo de investigación titulado: Diferencias en Subpoblaciones Linfocitarias de Pacientes con Trombocitopenia Inmune y Controles

Registrado ante el Comité Local de Investigación o la CNIC con el número:

El objetivo del estudio es: Conocer los niveles de linfocitos B, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T cooperadores, células natural killer (NK), células dendríticas y células T reguladoras en pacientes con trombocitopenia inmune y compararlos con los niveles obtenidos de una muestra de individuos sin esta enfermedad.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en: Aportar una muestra de sangre y datos clínicos

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes: No implica ningún riesgo, las molestias consistirán en la punción para la extracción de sangre. El beneficio que se obtendrá es aportar información para el mejor conocimiento de mi enfermedad y esto pudiera en un futuro mejorar el tratamiento de los pacientes con mi enfermedad.

El investigador responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que se deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del paciente:

Nombre, firma y matrícula del Investigador Responsable: Dr. Jaime García Chávez.

Testigos:

Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio: 57 24 59 00 Ext 23213

TABLA PARA EL ANÁLISIS

	MEDIA PACIENTES	MEDIA CONTROLES	VALOR DE t	VALOR DE p
EDAD				
PLAQUETAS				
CELULARIDAD				
NUCLEADAS TOTALES				
CD19+ CD20+				
CD3+ CD4+ CD8+				
CD3-, CD16 + CD 56+				
lin 1+ HLA-DR+ CD11c+ CD123+				
CD4+ CD25+ Foxp3+				

	PACIENTES	CONTROLES	VALOR DE X ²	VALOR DE p
MASCULINO				
FEMENINO				