



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

UMAE ESPECIALIDADES "DR. ANTONIO FRAGA MOURET"

CENTRO MÉDICO NACIONAL "LA RAZA"



**CORRELACIÓN ENTRE SUB-POBLACIONES LINFOCITARIAS BASALES Y LA RESPUESTA A
TRATAMIENTO CON PREDNISONA EN PACIENTES CON PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA
INMUNE DE RECIÉN DIAGNÓSTICO.**

TESIS

QUE PRESENTA

JOSÉ NOÉ ROMERO BAUTISTA

PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALISTA EN HEMATOLOGÍA

TUTOR: DR. JAIME GARCIA CHAVEZ.



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 División de Educación en Salud
UMAE Especialidades “Dr Antonio Fraga Mouret”
Centro Médico Nacional “La Raza”

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”

José Noé Romero Bautista.
Residente de 4º Año en Hematología.
UMAE Especialidades “Dr Antonio Fraga Mouret”
Centro Médico Nacional “La Raza”

Número de Proyecto: R-2010-3501-86.

INDICE

- I.** Resumen.
- II.** Abstract.
- III.** Introducción.
- IV.** Material y método.
- V.** Resultados.
- VI.** Conclusiones.
- VII.** Bibliografía.

RESUMEN

Título: Correlación entre sub poblaciones linfocitarias basales y la respuesta a tratamiento con Prednisona en pacientes con Púrpura Trombocitopénica Inmune de recién diagnóstico.

Objetivo: Determinar la proporción de pacientes con Púrpura Trombocitopénica Inmune de recién diagnóstico que aumentan su cuenta plaquetaria por arriba de 100 000/mm³ a los 30 días del tratamiento con Prednisona, en relación con las sub poblaciones linfocitarias basales de CD3, CD4, NK y NKT.

Material y método: se estudiaron pacientes con Purpura Trombocitopenica Inmune, mayores de 18 años, con criterios diagnósticos según la Sociedad Americana de Hematología, sin tratamientos médicos previos. Fueron motivo de exclusión la sospecha de embarazo, pacientes con otras alteraciones en la Biometría hemática además de la trombocitopenia, que orientaran a otros diagnósticos, además de aquellos pacientes recurrentes de la enfermedad. Todos otorgaron firma en hoja de consentimiento informado.

Se obtuvo sangre total para determinar niveles basales de plaquetas y linfocitos, para la determinación de subpoblaciones linfocitarias se realizó citometría de flujo. Los datos obtenidos se correlacionaron con prueba de Pearson cuadrada.

Resultados: se estudiaron 15 pacientes. Encontrando una predilección por el género femenino sobre el masculino 2:1. Se encontró correlación entre las subpoblaciones de linfocitos CD3, NK y NKT, y la respuesta al tratamiento de primera línea con Prednisona.

Conclusiones: los enfermos con Purpura trombocitopenica Inmune, tienen diferentes subpoblaciones de linfocitos, esta diferencia está relacionada con la fisiopatología de la enfermedad y tiene correlación con la respuesta al tratamiento.

Palabras clave: Purpura Trombocitopenica Inmune, subpoblaciones de linfocitos, tratamiento.

ABSTRACT

Title: Correlation between lymphocyte sub populations basal and the response to treatment with Prednisona in patients with Immune Thrombocytopenic Purpura of newly diagnosis.

Goal: Determine the patients' proportion with Immune Thrombocytopenic Purpura of newly diagnosis that increase his account platelets overhead of 100 000/mm³ to 30 days of the treatment with Prednisona, in relation with the lymphocyte sub populations basal of CD3, CD4, NK and NKT.

Methods: We studied Patients with Immune Thrombocytopenic Purpura, major of 18 years, with diagnostic criteria according to American Society Of Hematology, without medical previous treatments. They were a motive of exclusion the suspicion of pregnancy, patients with other alterations in the hematic Biometry besides the trombocitopenia, which they were orientating to other diagnoses, besides those patient appellants of the disease. They all granted signature in leaf of informed assent.

Total blood was obtained to determine basal levels of platelets and lymphocytes, for the determination of lymphocyte sub populations, we realize flowcitometria. The obtained information was correlated by test of square Pearson.

Results: 15 patients were studied. Finding a predilection for the female on the men, of 2:1. One found correlation between the lymphocyte sub populations CD3, NK and NKT, and the response to the treatment of the first line with Prednisona.

Conclusions: The patients with Immune Thrombocytopenic Purpura, have different lymphocyte sub populations, this difference is related to the physiopathology of him disease and has correlation with the response to the treatment.

Key words: Immune Thrombocytopenic Purpura, lymphocyte sub populations, treatment.

INTRODUCCIÓN

La Púrpura Trombocitopénica Inmune (PTI), es una causa frecuente de atención médica en la práctica hematológica, las características clínicas de presentación súbita, sin antecedentes previos en la mayoría de los casos de comorbilidad asociada, además del síndrome purpúrico y hemorrágico graves hacen de esta una patología única.

La purpura trombocitopénica inmune llamada también idiopática, es en conjunto un síndrome donde se encuentra la asociación de alteraciones en la producción plaquetaria con incremento en su destrucción periférica mediada por auto anticuerpos dirigidos contra la superficie de su membrana; Se ha demostrado que la destrucción de plaquetas se lleva a cabo en los macrófagos del sistema monofagocítico (antes llamado retículo endotelial) a nivel esplénico ⁽¹⁾, pero todavía no se conocen los mecanismos inmunológicos involucrados en la destrucción; Los auto anticuerpos encontrados son de tipo IgG tienen una depuración acelerada por el sistema fagocítico mononuclear a través de los receptores Fc (Fracción cristalizante) gamma; estos autoanticuerpos que reaccionan a las plaquetas principalmente se unen a las glicoproteínas del tipo GpIIb/IIIa, pero también lo hacen a complejos glucoproteicos Ib/IX, Ia/IIa, IV y V ⁽¹⁾.

La detección de anticuerpos antiplaquetas mediante prueba de inmunofluorescencia es empleada para investigar la presencia de anticuerpos unidos a las plaquetas PAIgG, el análisis directo de la medición de los anticuerpos unidos a las plaquetas tiene una sensibilidad estimada entre 49-66%, con especificidad de 78-92% ⁽²⁾; por otro lado la detección de anticuerpos libres en plasma, es de menor utilidad debido a su mayor variabilidad interlaboratorios y menor sensibilidad y especificidad; Por lo que aun la determinación de IgG asociada a plaquetas PAIgG o cualquier otro estudio hasta ahora no son suficientemente sensibles o específicos para PTI; ya que el resultado negativo no descarta el Diagnóstico, además de no ser útil para distinguir entre la forma primaria y secundaria.

Por lo que actualmente la determinación de algún Anticuerpo específico contra las GpIIb/IIIa, GpIb/IX, (menos sensibles 50-65%, especificidad 90%) junto con

la medición de trombopoyetina, se reserva para los casos complicados o de investigación.

Por estudios de tesis previos en pacientes con purpura trombocitopénica crónica o refractaria se conoce que existe algún grado de alteración en el estado inmunológico basal, específicamente en las sub poblaciones linfocitarias del tipo NK y NKT ⁽³⁾, las primeras que son capaces de destruir células tumorales sin que existan una sensibilización previa por lo que se conocen también como linfocitos nulos, ya que al no tener estímulo antigénico, no reordenan el gen de inmunoglobulinas ni el receptor de células T (TCR por sus siglas en inglés), si poseen en la superficie celular receptores de tipo KIR's (KillerInmunoglobulinlike receptor) y NCR's (Natural cytotoxicityreceptors), responsables del reconocimiento celular. Morfológicamente son linfocitos grandes y granulares, que expresan por inmunofenotipo CD56 y CD16, y ningún marcador B o T, representan 10% del total de células monocucleares en sangre periférica ⁽⁴⁾; y ejercen un papel importante en el paso de la respuesta innata a una respuesta inmune adquirida sin estímulo antigénico previo.

En cuanto a los linfocitos NKT son un sub tipo celular de linfocitos que desempeñan funciones similares a las células T colaboradoras y citotóxicas, con la diferencia de que estas reconocen glicolípidos restringidos por la molécula CD1d, glicoproteína no polimórfica similar a las moléculas clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Este subgrupo de células NKT se conoce desde entonces como "células T restringidas por CD1d", y la mayoría de ellas se caracteriza por un TCR conformado por una cadena alfa que tiene siempre el mismo rearreglo VaJa (Va24Ja18 en los humanos); con base en esta estructura constante se les ha dado el nombre de "células T invariantes restringidas por CD1d" o simplemente "células NKT invariantes" (iNKT); por inmunofenotipo expresan CD161 y CD3, representan solo 0.2% de los linfocitos periféricos ^(4, 5). Las células NKT tienen características particulares que permiten diferenciarlas de los linfocitos T clásicos y de las células NK, y que resaltan su importancia desde el punto de vista evolutivo e inmunológico, el TCR de las células NKT es altamente conservado, con una cadena alfa invariante cuya región hipervariable tiene una secuencia de aminoácidos muy constante en el sitio de unión a los epítopes antigénicos (región determinante

de la complementariedad o asa CDR3); esta cadena alfa invariante se aparea con un grupo restringido de cadenas beta, en el hombre casi de manera exclusiva con la cadena Vb11 ⁽⁶⁾.

Finalmente se ha demostrado que la activación de las células NKT conduce a la estimulación de las células NK, monocitos, células dendríticas, linfocitos B y linfocitos T ayudadores y citotóxicos, estableciendo un puente entre el desarrollo de las respuestas inmunes innata y adaptativa ⁽⁷⁾.

Epidemiológicamente no existen estudios que determinen la presentación de purpura trombocitopénica inmune, al menos en nuestro país; sabemos que la forma aguda es más frecuente en niños y la crónica en adultos, así los estudios mundiales han calculado una incidencia con un rango tan variable que va entre 1 a 12.5 casos por cada 100 mil personas/año; Con mayor afección por sexo mujer -hombre 3.1 - 2.6 entre edades 14 y 40 años, con un incremento progresivo después de los 60 años ⁽⁸⁾.

Las clasificaciones tradicionales la dividen por su presentación en primaria o secundaria, según se conozca o no la causa que la origina; O por el tiempo de evolución aguda y crónica o refractaria al manejo, siendo de especial interés, las primeras en el mecanismo de producción patogénico.

Clínicamente en este síndrome hemorrágico las petequias en piel y mucosas, la epistaxis y gingivorragia 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.

Anteriormente las decisiones terapéuticas se basaban, como sucede frecuentemente en medicina, en experiencias previas o de forma individual para cada paciente; sin embargo la evolución en el conocimiento de la enfermedad llevó a establecer guías de tratamiento para pacientes con PTI, en base a estudios controlados, publicados hace al menos 1 década; lo siguiente fue conocer la fisiopatología de la enfermedad, que si bien se ha relacionado a la presencia de alteraciones inmunológicas mediadas por anticuerpos dirigidos contra los antígenos de la superficie plaquetaria, los estudios actuales se

orientan hacia la evaluación de respuestas a manejo, gravedad del sangrado, afecciones funcionales secundarias al tratamiento y calidad de vida del paciente; por otro lado aun no se determinan los procesos implicados, y menos aun si estos tienen relación en el grado de respuesta al manejo de primera línea o si existe relación con la falta de respuesta al mismo ⁽⁹⁾.

Hipótesis previas han sido diseñadas, en modelos murinos, para tratar de comprender la biología, bases celulares y mecanismos inmunológicos en PTI, dando a conocer posibles nuevas terapias; por ahora lo interesante es determinar si estos modelos aplican a los pacientes afectados por la enfermedad, si existen estudios relacionados con el papel de los autoanticuerpos en esta enfermedad autoinmune; sin embargo poco se ha estudiado sobre la inmunorregulación o el papel implicado de células B o T, incluyendo el grupo de linfocitos NK y NKT, en cuanto a la producción de auto anticuerpos anti-plaqueta; si existe evidencia que sugiere que en la PTI crónica la producción de estos autoanticuerpos anti-plaqueta está bajo la influencia de varios mecanismos anormales mediados por linfocitos, no se conoce la implicación en los casos agudos, en el curso clínico de la enfermedad y mucho menos si existe importancia pronostica de la respuesta inmune mediada por células en esta enfermedad.

La citometria de flujo es una tecnología que permite medir diferentes características en una misma célula de forma simultánea, en primer lugar tamaño y granularidad, mediante la dispersión de luz laser y fluorescencia, diferentes anticuerpos expresados en la superficie de la membrana celular o en el citoplasma. Las mediciones se crean de una serie de reflexiones y refracciones a partir de un rayo de luz (laser), que conforman diferentes ángulos, traduciendo mediciones, expresado mediante una computadora en forma de puntos que son graficados, cada uno representando un evento (célula). Se pueden medir un gran número de estas, dando un valor bastante representativo de la muestra.

Los anticuerpos monoclonales son complejos proteicos del tipo glucoproteinas, de forma natural producida en el organismo y para los casos de investigación diagnóstico y hasta tratamiento son generados a través de ingeniería

molecular; los anticuerpos son capaces de unirse a una fracción antigénica específica y de esta forma poder catalogar grupos celulares o sub poblaciones.

Los que se utilizaran en el proyecto para el caso de linfocitos NK son antiCD16 que marca o se une a la fracción cristalizable de las inmunoglobulinas en sus receptores III y IIIa. AntiCD56 que es un marcador de adhesión celular neuronal (NCAM), útil en procesos de diferenciación y desarrollo celular, finalmente un AntiCD3 Negativo, que se expresa normalmente en el grupo celular linfoide, como parte de su receptor natural.

Para el grupo de linfocitos NKT los marcadores serán CD3 y TCR (Receptor de Células T), con una expresión variable del polimorfismo de este último.

JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento, no existen en México estudios clínicos relacionados al estado inmunológico basal, de pacientes con Purpura Trombocitopénica idiopática de recién diagnóstico, los reportes de casos han sido realizados en modelos experimentales. No existe al parecer estudios que evalúen la cantidad y función de las células NK y NKT⁽¹⁰⁾ en Purpura trombocitopénica idiopática.

Nos interesa conocer mediante la determinación de sub poblaciones de linfocitos, NK y NKT, la diferencia para pacientes con purpura trombocitopénica idiopática, y si esto tiene importancia en el grado de respuesta al tratamiento de primera línea.

Esperando encontrar relación con el estado inmunológico celular bajo aquellos pacientes que no tendrán una buena respuesta al tratamiento con esteroide, de acuerdo a las dos sub poblaciones a determinar (NK-NKT), y de esta forma poder ofrecer al paciente el beneficio del tratamiento de 2ª línea que es quirúrgico (esplenectomía), en lugar de continuar con medicaciones inmunosupresoras alternas.

MATERIAL Y METODO.

Para el análisis el grupo de estudio incluyó a pacientes adultos con diagnóstico de Purpura Trombocitopenica Inmune de acuerdo a los criterios de la ASH ^(Anexo1), de novo, sin manejo médico previo, vistos por el servicio de Hematología del Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”, del Centro Médico Nacional La Raza.

Fue un grupo heterogéneo que incluyó hombres y mujeres mayores de 18 años, sin manejo médico previo alguno, lo que hacía considerar al paciente con enfermedad de novo, siendo candidatos a recibir tratamiento de primera línea con Prednisona por vía oral, previa firma de consentimiento informado. Fueron criterios de no inclusión la sospecha de embarazo, pacientes con otras alteraciones en la Biometría hemática además de la trombocitopenia, que orientaran a otros diagnósticos médicos, además de aquellos pacientes recurrentes de la enfermedad.

Fue motivo de eliminación para aquellos pacientes del sexo femenino la presencia de embarazo durante el periodo de tratamiento, aun cuando este fue corto, que se retirara la carta de consentimiento informado o que abandonaran el tratamiento en el periodo establecido como inicial.

A todos los pacientes se les tomo muestra de Biometría hemática que se proceso en un Equipo Advia 120 HematologySystem de la Marca SIEMENS; mas una muestra de 5 cc de Sangre periférica, obtenida por venopunción y vertida a un tubo con anticoagulante del tipo EDTA. (Anticoagulante – EtilenDiaminotetracético), para la determinación de subpoblaciones Infocitarias en un equipo FACSCaliburSystem – Citometro de flujo de BectomDickinsonInmunocytometrySystem (BDIS): de la siguiente manera: Se colocaron en un tubo Falcon 1X 10⁶células en 100 mL de amortiguador de fosfatos, se adicionaron 20 mL de anticuerpo (CD3FITC/CD16+56PE) marcado con los diferentes fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina(PE).

Se mezcló e incubó durante 20 minutos a 4°C en la oscuridad, transcurrido el tiempo se adicionó 1 mL de solución de lisis (1: 10) y se mezcló e incubó durante 10 minutos a 4°C en la oscuridad; una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 1500 r.p.m

durante 5 minutos, se decantó y se adicionaron 2 mL de amortiguador de fosfatos y se resuspendió, se volvió a centrifugar a 1500 rpm durante otros 5 minutos, transcurrido el tiempo se eliminó el sobrenadante y se adicionó 0.8 mL de amortiguador de fosfatos más 0.2 mL de paraformaldehído al 1% en solución salina isotónica. Se resuspendió en vórtex a baja velocidad y finalmente con el tubo en esas condiciones se adquirieron los datos.

Adquisición de datos: Se adquirieron 50,000 eventos en el programa de “CellQuest Pro” versión 3.2.1 “Apple System” 7.6.1 y se seleccionó la región linfoide, esto se hizo con el tubo marcado como control de isotipo (autofluorescencia). Se adquirió toda la población celular y se seleccionó la región mononuclear ajustando primero la autofluorescencia de las células, colocando los marcadores de los cuadrantes en una gráfica de puntos “dotplot” en la escala logarítmica 10^1 , tanto para el eje de las abscisas (FL1 isotiocianato de fluoresceína) como para el eje de las ordenadas (FL2 ficoeritrina), colocando dicha autofluorescencia en el cuadrante inferior izquierdo en un porcentaje mínimo de 98.0%. Una vez fijados los marcadores de autofluorescencia, se procedió a adquirir las suspensiones celulares de los demás tubos en donde ya había células a las cuales estaban unidos los anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos (isotiocianato de fluoresceína o ficoeritrina), respetándose tanto la región como la localización de los cuadrantes. Se obtuvieron los resultados de dicha región para los diferentes marcadores celulares en forma de porcentaje.

Las subpoblaciones de linfocitos se determinaron a través de marcadores monoclonales contra proteínas de membrana de acuerdo al siguiente orden:

- $CD3 \mu L = (CNT_{\mu L}) / (\%Lf) / (\%CD\cdot 3^+)$.
- $CD4 \mu L = (CNT_{\mu L}) / (\%Lf) / (\%CD 4^+)$.

- $NK \mu L = (CNT_{\mu L}) / (\%Lf) / (\%CD\cdot 3^+ CD16+56^+)$.
- $NKT \mu L = (CNT_{\mu L}) / (\%Lf) / (\%CD\cdot 3^+ CD16+56^+)$.

Se tomara una nueva determinación de Biometría hemática, para conocer la cuenta de plaquetas posterior al tratamiento de primera línea a los 21 días. Y después de 8 días sin manejo medico (periodo de lavado), lo que se considero como respuesta al tratamiento.

Se obtuvieron los datos en una hoja de Excel del programa Office 2007, para determinar la correlación entre la determinación de subpoblaciones linfocitarias y la respuesta al tratamiento se realizo cuadrada de Pearson.

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

RESULTADOS

Debido a la diversidad de criterios entre varios autores, como indicador de respuesta al tratamiento médico en pacientes con Purpura Trombocitopénica Inmune, se tomo en cuenta lo establecido en el último consenso internacional de investigación y tratamiento de pacientes con trombocitopenia inmune primaria ⁽¹⁰⁾.

Respuesta completa o remisión completa es una cuenta plaquetaria en sangre periférica mayor a $100 \times 10^9/L$ y ausencia clínica de sangrado.

Para el estudio se incluyeron 15 pacientes, la distribución por género fue 2 mujeres por 1 hombre, como se muestra en el Grafico 1.

Grafico 1. Distribución de Genero, pacientes con Purpura Trombocitopénica Inmune.



En la Biometría hemática de los pacientes al diagnóstico la media de su cuenta de plaquetas fue de 9183/ml, y la de leucocitos totales de 1765/ml.

Los resultados de Las subpoblaciones linfocitarias, de los pacientes con Purpura Trombocitopénica Inmune se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Subpoblaciones linfocitarias de pacientes con Purpura Trombocitopénica Inmune

Control		SUBPOBLACIONES			
PACIENTES	De Plaquetas #/ml	CD3 #/ μ L	CD4 #/ μ L	NK #/ μ L	NKT #/ μ L
1	55000	1892	695	287	407
2	69000	1208	731	212	96
3	14000	1893	1035	154	88
4	261000	711	268	117	23
5	42000	725	317	295	68
6	99000	214	86	9	0
7	77000	1442	1006	245	109
8	298000	1518	930	294	49
9	21000	2785	1065	328	287
10	203000	2666	1523	114	457
11	23000	1121	463	1023	390
12	63000	1282	751	309	44
13	123000	217	93	52	31
14	16000	1542	989	46	92
15	439000	619	410	146	18

Impresiona que a menor cantidad de células CD3, CD4, NK y NKT, mejor respuesta en la cuenta plaquetaria. Se realizó correlación de Pearson - objeto del presente estudio encontrando, que existe correlación entre la respuesta al tratamiento de primera línea, con respecto a las subpoblaciones linfocitarias CD3, NK y NKT, aun cuando esta es baja como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Correlación de subpoblaciones linfocitarias y respuesta al tratamiento.

Correlacion Pearson	
CD3	0.5039
CD4	0.3706
NK	0.5095
NKT	0.5164

DISCUSIÓN

La purpura trombocitopenica inmune, se encuentra dentro de las enfermedades hematológicas, como su nombre lo dice de causa auto-inmune, en la cual existe una disminución de la cuenta de plaquetas circulantes, principalmente por fagocitosis de células opsonizadas por un auto-anticuerpo ⁽¹⁾, pero la falta de correlación completa entre el comportamiento clínico de la enfermedad y el título de anticuerpos sugirió la presencia de otros mecanismos fisiopatológicos involucrados en la génesis de la trombocitopenia.

Hasta ahora la vía más estudiada es la vía humoral, principio de la enfermedad; sin embargo existen grupos celulares que se encuentran involucrados en la fisiopatología estas incluyen células presentadoras de antígeno, células productoras de anticuerpos, células efectoras y células reguladoras; No se tiene reporte hasta el momento de una evaluación cuantitativa completa de estas distintas subpoblaciones inmunológicas en un grupo de pacientes con Purpura trombocitopenica inmune; punto clave para terminar de comprender la fisiopatología y los mecanismos inmunes involucrados de esta patología y como consecuencia, a largo plazo, orientar mejor el tratamiento de los pacientes.

Si bien Hipótesis previas han sido diseñadas, en busca de factores pronósticos y/o alteraciones que nos permitieran conocer el estado inmunológico basal, no se había determinado si este estado tiene relación con la respuesta al tratamiento; A partir de este conocimiento se ha podido identificar la falta de regulación de distintas subpoblaciones de linfocitos en la destrucción inmune de las plaquetas circulantes y en la disminución de la producción de las plaquetas por los megacariocitos medulares (11). Y si bien se han descrito alteraciones en la secreción de diferentes interleucinas (12) y alteración específica de un grupo celular (13), en nuestro medio no se conocen el impacto clínico en cuanto a la respuesta al tratamiento, es por eso que el objetivo de esta investigación fue Determinar la correlación de pacientes con Púrpura Trombocitopénica Inmune de recién diagnóstico que aumentan su cuenta plaquetaria hasta una respuesta completa considerando esta, una cuenta por arriba de 100 000/mm³ a los 30 días del tratamiento con Prednisona,

correlacionando contra las sub poblaciones linfocitarias basales de NK y NKT, agregando 2 sub poblaciones más que no se habían investigado previamente CD3 y CD4.

Debido a que no se cuenta con información previa de este fenómeno biológico, no se realizó un cálculo formal del tamaño de la muestra necesario para observar diferencia significativa, en cambio se realizó muestreo a conveniencia, incluyendo un total de 15 pacientes, reunidos a partir de la autorización del protocolo de investigación.

En un artículo publicado por Mylvaganam y colaboradores en 1988, el objetivo principal fue conocer las variaciones fenotípicas de los linfocitos circulantes, no encontrando diferencias, con el primer mecanismo inmune propuesto, que fue el humoral, la explicación a la ausencia de diferencias en el número de células B circulantes entre enfermos con purpura trombocitopenica inmune, puede ser que no solo reside en que la producción de estas células se encuentre normal, si no que la alteración se deba a su activación incrementada, por otros tipos celulares como linfocitos T, efecto correlacionado en el presente estudio. Comparativamente con el número de células CD4, y linfocitos natural killer (NK) y NKT.

Las células NK y NKT, se han propuesto como las involucradas en la citotoxicidad directa contra los megacariocitos de pacientes con trombocitopenia inmune, diversos estudios han sugerido que la disminución de las plaquetas en pacientes con trombocitopenia inmune no solo 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 (14). En la literatura revisada para este trabajo, no se encontró ningún otro estudio que reportara niveles de células NK y NKT en esta enfermedad. Esta alteración no solo fue de tipo cuantitativo, sino que además pudieron demostrar alteraciones funcionales, principalmente al exponer las células T a un estimulo blastogénico. Incluso los autores concluyen que la trombocitopenia inmune se debe a una disfunción de las células T, independientemente de factores humorales dependientes de células B.

Una explicación a este fenómeno la plantea Chang-Lin y colaboradores, al demostrar que los pacientes con trombocitopenia inmune tienen linfocitos con predisposición a la apoptosis, ya que tienen una expresión de diferentes proteínas proapoptóticas como FAS, FASL, BCL2, y BAX.

En la tabla 1 se demuestra cada una de las subpoblaciones por cada paciente, sin embargo se requirió de realizar una prueba de correlación para determinar si el efecto entre las variables es directo o solo motivo del azar, encontrando correlación en 3 de las 4 subpoblaciones estudiadas, con poco más de 0.50, que si bien es débil si demuestra tendencia de correlación, y por lo tanto no es despreciable. Los resultados pueden estar justificados por la "n" pequeña del grupo de estudio.

Finalmente cabe mencionar que el sistema inmune humano tiene la capacidad de diferenciar lo propio de lo ajeno, favoreciendo la producción de anticuerpos y la producción 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 reactivas; dando como consecuencia pérdida de la homeostasis y por tanto pérdida de la tolerancia inmune a los tejidos propios, con el daño mediado secundario, motivo de continuar con el estudio en diferentes poblaciones para poder ayudar a diferenciar si la tendencia de este estudio es significativa o no, situación mejorable con el incremento en el número de pacientes para poder consolidar el conocimiento.

CONCLUSIONES

La purpura trombocitopenica inmune se encuentra dentro de las enfermedades auto inmunes, de atención frecuente en la población adulta, de ambos sexos, con predominio de afección por el sexo femenino.

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 correlaciono subpoblaciones de linfocitos en pacientes adultos con trombocitopenia inmune primaria de recién diagnóstico, con la respuesta al tratamiento de primera línea – Prednisona.

Se observó una correlación significativa en los niveles de linfocitos T CD3+, NK, NKT.

Se requieren estudios con una población mayor y análisis funcionales para explicar mejor la participación de estas subpoblaciones en el origen de la trombocitopenia inmune, además del comparación con terapias de segunda línea y el seguimiento a largo plazo.

BIBLIOGRAFÍA

1. George J.N., Beardsley D.S., Warkentin T.E., et al. ITP in the 21st Century. American Society Of Hematology. Hematology.2006; 402-407.
2. DouglasB. C., Victor S. B., Lanchette M.B. Inmune Thrombocytopenic Purpura. N Engl J Med. 2002; 346: 995-1008.
3. Mylvaganam R, Garcia R., Ahn Y.S., et al. Depressed Functional and Phenotypic Properties of T but not B Lymphocytes in Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. Blood. 1988; 71: 1455-60.
4. Wintrobe. Clinical hematology. 11^a edición. Lippincott Williams & Wilkins; USA, 2009.
5. Godfrey D.I., MacDonald H.R., Kronenberg M., et al. NKT cells: What's in a name?. Nat Rev Immunol. 2004; 4: 231- 37.
6. Gumperz J.E., Antigen specificity of semi-invariant CD1d-restricted T cell receptors: the best of both worlds?.Immunol Cell Biol. 2004; 82: 285-94.
7. Wilson S.B., Delovitch T.L. Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumor immunity. Nat Rev Immunol. 2003; 3: 211-222.
8. Frederiksen H., Schmidt Kai. The Incidence of Idiopathic Thrombocytopenic Purpurain Adults Increases With Age. Blood. 1999; 94: 909 – 913.
9. Gernsheimer T.B., The Pathophysiology of ITP Revisited:Ineffective Thrombopoiesis and the EmergingRole of Thrombopoietin Receptor Agonists inthe Management of Chronic ImmuneThrombocytopenic Purpura. American Society Of Hematology. Hematology 2008; 210–226.
- 10.Provan D., Stasi R., Newland C. A.; International consensus report on the investigation and management of primaryimmune thrombocytopenia. Blood. 2010; 115:168-186.
11. Chong BH. Primary Inmune thrombocytopenia: Understanding pathogenesis is the key to better treatments. J. Thromb. Haemost. 2009; 7(2):319-321.
- 12.Yu J., Heck S, Patel V, et al. Defective Circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic inmune thrombocytopenic purpura. Blood. 2008;112(4)1325-1328.
- 13.Mylvaganam R, García 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.
- 14.Stasi R, Evangelista ML, Stipa E, et. al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management. J. Thromb. Haemost. 2008;99(1):4-13.

ANEXOS

ANEXO 1.

CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE PURPUR TROMBOCITOPENICA INMUNE SEGÚN LA SOCIEDAD AMERICANA DE HEMATOLOGÍA.

Elementos de la Historia y Examen Físico
❖ Historia
<ul style="list-style-type: none">• Síntomas de sangrado<ul style="list-style-type: none">- Tipo de sangrado- Grado del sangrado- Duración del sangrado- Hemostasia en eventos previos Cirugías, embarazos.• Síntomas sistémicos, incluyendo perdida de peso, fiebre, cefalea y síntomas de enfermedades autoinmunes como: artralgias, rash cutáneo, alopecia y trombosis venosa.• Factores de Riesgo para infección por VIH• Embarazo• Medicaciones incluyendo: heparina, alcohol, quinidina, quinina y sulfonamidas, que puedan causar trombocitopenia, y Aspirina que pueda exacerbar el sangrado.• Historia transfusional• Historia familiar de trombocitopenia, incluyendo síntomas de sangrado y síntomas de enfermedades inmunológicas.• Comorbilidades que puedan incrementar el riesgo de sangrado, como enfermedad gastrointestinal, enfermedades del sistema nervioso central y enfermedades urológicas.• Estilo de vida, incluyendo actividades vigorosas y potencialmente traumáticas.
❖ Examen físico
<ul style="list-style-type: none">• Signos de sangrado<ul style="list-style-type: none">- Tipo de sangrado (incluyendo hemorragia retiniana)- Grado del sangrado• Hígado, bazo y ganglios linfáticos; ictericia y otros estigmas de enfermedad hepática.• Evidencia de infección, particularmente bacteriemia o infección por VIH.• Evidencia de enfermedad autoinmune, como artritis, bocio, nefritis o vasculitis cutánea.• Evidencia de trombosis• Función neurológica.• Anormalidades esqueléticas.

ANEXO 2.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Por medio de la presente deseo participar en el protocolo de investigación titulado: Correlación entre sub-poblaciones linfocitarias basales y la respuesta a tratamiento con Prednisona en pacientes con Púrpura Trombocitopénica Inmune de recién diagnóstico.

Registrado ante el comité local de investigación o la CNIC con el número: **2010 – 3501 - 087**

El objetivo del estudio es Conocer la proporción de pacientes con Purpura Trombocitopénica Inmune de recién diagnóstico que aumentan su cuenta plaquetaria por arriba de 100 000/mm³ a los 30 días del tratamiento de primera línea. Se me ha explicado que mi participación consistirá en: Aportar una muestra de sangre y datos clínicos. Este documento tiene el objeto de formalizar y hacer constar el consentimiento informado para la atención médica, entre el paciente y/o familiar o tutor, y el investigador principal del estudio: Dr. Jaime García Chávez, del servicio de Hematología del Hospital de especialidades Centro Medico Nacional La Raza, en cumplimiento de los artículos 22, de la Ley del seguro social, 6º, 59º y 64º del reglamento de la ley general de salud en materia de prestaciones de servicios de Atención Médicas, y a los puntos 4.2 y 10.11 de la Norma Oficial Mexicana NOM. 168-SSA 1-1998, del expediente clínico, publicado en el Diario Oficial de la Federación el día 30 de Septiembre de 1999. El suscrito- paciente: _____, con numero de seguridad social: _____, en pleno uso de mis facultades y en el ejercicio de mi capacidad DECLARO lo siguiente: 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, además de conocer el estado inmunológico basal, y si esto tiene alguna modificación con mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevaran 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 medica que recibo en el instituto mexicano del seguro social. Se me ha garantizado la salvaguarda de mi intimidad, privacidad y que no se me identificara en las presentaciones o publicaciones de los resultados del estudio. En caso de duda o aclaración se podrá comunicar con el investigador asociado José Noé Romero Bautista al teléfono: 044-55-27682635.

México, D.F. a Día: ____ del mes de: _____ de 2010.

Nombre y firma del paciente.
Principal.

Dr. Jaime García Chávez Investigador

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma del testigo.

ANEXO 3.

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

FOLIO:	
Nombre	
Número de seguridad social	
Genero	
Edad	
Cuenta inicial de Plaquetas	
Subpoblaciones linfocitarias	
NK	
NKT	
Cuenta de plaquetas a los 30 días de Tratamiento	