



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DELEGACIÓN SUR DEL DISTRITO FEDERAL
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI

T E S I S

QUE PRESENTA

DR. CARLOS ABEL ROJAS AQUINO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE LA ESPECIALIDAD EN:

HEMATOLOGÍA

“Expresión del Fc γ R IIb (CD 32b) en Linfocitos B de sangre periférica de pacientes con
Trombocitopenia Inmune Primaria, en el servicio de Hematología del Hospital de
Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI”

No. REGISTRO: R-2011-3601-5

ASESOR:

DR. GUILLERMO R. GUTIÉRREZ ESPÍNDOLA

MÉXICO, D.F. A 22 de Febrero del 2011



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.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud

Dictamen de Autorizado

COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD 3601
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DR. BERNARDO SEPULVEDA GUTIERREZ, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO
XXI, 3 SUROESTE DEL D.F.

FECHA 14/02/2011

DR.(A). GUILLERMO RODOLFO GUTIÉRREZ ESPÍNDOLA

P R E S E N T E

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

Expresión del FcγR IIb (CD 32b) en monocitos, células dendríticas y Células B de Sangre periférica en pacientes con Purpura Trombocitopénica Inmune, en el servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI

que usted sometió a consideración de este Comité Local de Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro
R-2011-3601-5

ATENTAMENTE

DR.(A). CARLOS FREDY CUEVAS GARCÍA

Presidente del Comité Local de Investigación en Salud núm 3601

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

Dra. Diana G. Menez Díaz

Jefe de la División de Educación e Investigación en Salud
U.M.A.E. Hospital de Especialidades
“Dr. Bernardo Sepulveda”
Centro Médico Nacional Siglo XXI

Dr. Luis Antonio Meillón García

Profesor Titular del Curso de Hematología
U.M.A.E Hospital de Especialidades
“Dr. Bernardo Sepulveda”
Centro Médico Nacional Siglo XXI

Dr. Guillermo Rodolfo Gutiérrez Espíndola

Asesor de Tesis
Médico Adscrito al Servicio de Hematología
U.M.A.E. Hospital de Especialidades
“Dr. Bernardo Sepulveda”
Centro Médico Nacional Siglo XXI

Dr. Carlos Abel Rojas Aquino

Investigador Principal
U.M.A.E. Hospital de Especialidades
“Dr. Bernardo Sepulveda”
Centro Médico Nacional Siglo XXI

COLABORADORES DE TESIS

Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes
U.M.A.E. Hospital de Especialidades
“Dr. Bernardo Sepulveda”
Centro Médico Nacional Siglo XXI

Martha Patricia Rojo Aguilar
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes
U.M.A.E. Hospital de Especialidades
“Dr. Bernardo Sepulveda”
Centro Médico Nacional Siglo XXI

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Quien me ha brindado muchas bendiciones entre ellas el conocer humano...

A MI ESPOSA LAURA Y MI HIJA LILIA

Que son costilla y sangre mia, impulso de mi vida dia a dia.

A MI MAMITA CHULA LILIA Y MIS HERMANITOS LUIS Y ARI

Por ser mis guías en el camino y compartir mis logros y derrotas, impulsarme a ser mejor cada día, por todos sus sacrificios, sus consejos, pero ante todo por su amor incondicional.

A MI PADRE ABEL[†]

Quien compartio todo lo aprendido en su vida, dió fuerza a mi espíritu y me enseñó, Junto a mi Madre, a seguir adelante en tiempos dificiles.

A MIS MADRINAS TITA, ZAYDI, IRMITA, LESVI[†], SUSI y CHUSI; A MIS PADRINOS PEPE, ROMAN, CARLOS, JAIME[†], RAFITA Y GUILLERMO

Quienes han sido apoyo y fortaleza en mi vida. Angeles que han cuidado de mí.

A MIS COMPAÑEROS SINDITA, LUISITO, CHAVITA Y DEN

Por haber compartido cada momento, en especial los dificiles, de éstos 3 años, y haberme brindado su alegría y entusiasmo.

AL DR. GUILLERMO GUTIERREZ ESPINDOLA

Por haber tenido fé en mí y en mi trabajo, brindándome su paciencia y sabiduría. Por su ayuda para concluir mi tesis.

A LA DRA LAURA BONIFAZ ALFONSO

Por su apoyo tan importante para la realización de esta Tesis y haber tenido fé en la idea propuesta.

A TODOS LOS MÉDICOS DEL SERVICIO DE HEMATOLOGÍA DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SXXI

Dra Nancy Delgado López, Dr. Fernando Pérez Rocha, Dra. Cynthia Gómez, Dr. Eduardo Terreros, Dr Jesus Medrano , Dr. Alejandro Fernández, Dra. Susana Guerrero, Dra. Elizabeth Sánchez, Dra. Margarita Contreras, Dr. Carlos Roberto Hernández, Dr. Kevin Nacho, Dr. Leonardo Mendoza y al Jefe del Servicio Dr. Luis Antonio Meillón. Por compartir su experiencia y sus conocimientos y sobre todo su paciencia durante el proceso de nuestra enseñanza y por ser nuestra familia en estos tres años.

Además mi agradecimiento a las Químicas Rocío Godínez, Laura Rabelo, y a la Srita. Brenda Perez.

ÍNDICE

	Página
I. RESÚMEN.....	7
II. INTRODUCCIÓN.....	9
III. DEFINICION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	21
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	22
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
VI. ANÁLISIS.....	28
VII. RESULTADOS.....	30
VII. DISCUSIÓN.....	44
VIII. CONCLUSIÓN.....	50
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	51

RESUMEN

Expresión del FcγR IIb (CD 32b) en Linfocitos B de sangre periférica en pacientes con Trombocitopenia inmune primaria
Rojas Aquino CA*, Gutiérrez Espíndola G*, Bonifaz LA[¶], Rojo MP[¶], Meillon Garcia LA*

*Servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI "Dr Bernardo Sepúlveda" IMSS

Laboratorio de Inmunoreumatología del Hospital del Especialidades del CMN SXX" Dr Bernardo Sepúlveda"

INTRODUCCIÓN: CD 32b es una molécula inhibitoria que juega un papel de importancia en la tolerancia inmune periférica. Esta molécula se encuentra distribuida en todos los elementos de respuesta inmune: linfocitos B, monocitos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos, basófilos. Estudios previos han observado un incremento en la expresión de CD 32b en Linfocitos B naive en pacientes con LES. La Trombocitopenia Inmune Primaria (PTI), es una patología con fondo autoinmune y en cuya fisiopatología se involucran muchos elementos de la respuesta inmunológica secundaria.

OBJETIVO: Determinar la Expresión del FcγR IIb (CD 32b) en Linfocitos B de Sangre periférica en pacientes con Purpura Trombocitopénica Inmune, en el servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI

MATERIAL Y METODOS: Tipo de estudio: Casos y Controles, transversal, observacional y descriptivo. Se tomo como universo a todos los pacientes con trombocitopenia inmune primaria. La muestra fue seleccionada aleatoriamente en pacientes con TIP de novo y en seguimiento a partir de criterios de inclusión y exclusión establecidos. Se agrupo a pacientes a partir del conteo plaquetario en grupos de respuesta completa, respuesta parcial y sin respuesta a partir de criterios del International Working Group. Así también se distribuyeron en 2 grupos de TIP activa y No activa, con esteroides y sin esteroides por mas de 1 mes. Las muestras de los pacientes con TIP se obtuvieron de sangre periférica, previo consentimiento informado, en la consulta externa y en hospitalización. Los controles fueron obtenidos de Buffy Coats de donadores sanos donadores de la unidad de Investigación en Inmunología del CMN S XXI. Se analizó el porcentaje de expresión de CD 32b y la Intensidad media de Fluorescencia mediante citometria de flujo. Para el análisis estadístico se usaron los programas Microsoft Excel, SPSS 17.0 y GraphPad Prism 5.

RESULTADOS: El estudio se realizó durante el periodo comprendido entre el 27 de abril y 22 diciembre del 2010. Se incluyeron 31 pacientes con Trombocitopenia Inmune primaria, 10 en respuesta completa(32.25%), 14 en respuesta parcial (45.16%) y 7 pacientes sin respuesta(22.58%). 9 de ellos con TIP de novo (29.03%). En su distribución por género 23 fueron femeninos(74.19%) y 8 masculinos(25.81%). La edad mediana de los pacientes fue de 46 años con rangos de 18 a 90 años. La expresión de CD 32b y la intensidad media de fluorescencia en células B fue significativamente mayor en los pacientes con TIP en relación a los controles($p < 0.0001$). No hubo correlación entre el conteo plaquetario, la intensidad media de fluorescencia de CD 32b(r Pearson=0.0580) y el porcentaje de expresión de CD 32b (r Pearson=0.0671). El porcentaje de expresión y la intensidad media de fluorescencia de CD 32b promedio en Células B de pacientes con TIP vs Controles fueron 50.10% (DE=10.36)vs 19.80%(DE=8.13) y 31.17 IMF (DE=9.92) vs 9.37(DE 3.15), respectivamente.

CONCLUSIONES:

CD 32b se encuentra sobreexpresado en los pacientes con trombocitopenia inmune primaria en relacion a los controles normales. Se requieren mas estudios para definir si esta molécula es un marcador presente de etiología no precisada.

PALABRAS CLAVE: *Trombocitopenia Inmune Primaria, CD 32b, IMF*

1.Datos del alumno (Autor)	1.Datos del alumno
Apellido paterno Apellido Materno Nombres Teléfono Universidad Facultad o escuela Carrera No. De cuenta	Rojas Aquino Carlos Abel 57 60 32 90 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Médico Cirujano Especialista en Hematología 506217267
2.Datos del asesor	2.Datos del asesor
Apellido paterno Apellido Materno Nombres	Gutiérrez Espíndola Guillermo Rodolfo
3.Datos de la tesis	3.Datos de la tesis
Título No. de páginas Año	Expresion de CD 32b en Linfocitos B en pacientes con Trombocitopenia Inmune Primaria 2011

INTRODUCCIÓN

La Trombocitopenia Inmune Primaria (TIP) es un síndrome autoinmune que envuelve la destrucción plaquetaria mediada por células y anticuerpos así como la supresión de producción plaquetaria que predispone a Hemorragia

La incidencia estimada de TIP en adultos es de 1.6 a 3.9 por 100,000 personas por año, con una prevalencia de 9.5 a 23.6 por 100,000 personas, en base a los códigos de diagnóstico en el registro de salud de UK. ¹

ANTECEDENTES HISTORICOS

La descripción inicial de la TIP en adultos es atribuida a Werlhof, quien en 1735 reportó a una joven mujer que presentó inicio súbito espontáneo de petequias, equimosis y hemorragia en membranas mucosas. Ella presentó recuperación clínica espontánea, a diferencia de la enfermedad purpúrica fatal que era causada por tifo y la plaga.

Harrington y colaboradores en 1951 demostraron que la infusión de sangre total o plasma de pacientes con ITP en voluntarios normales causa Trombocitopenia, y estudios subsecuentes identificaron el principio activo en el plasma de los pacientes con ITP como Gama Globulina. ²

ETIOLOGIA

Los defectos en la producción de anticuerpos son desconocidos. Heredabilidad es no común, pero existen polimorfismos predisponentes en citoquinas y Receptores Gamma Fc, descritos. Un perfil de citoquinas Th1/Th0, una reducción de células T reguladoras supresoras, y un incremento en activadores de células B puede predisponer a la creación de autoanticuerpos en respuesta a antígenos exógenos.^{3, 4} El Mimetismo molecular juega un papel importante en el desarrollo de autoanticuerpos plaquetarios después de la vacunación o de infecciones ,

como en infección por HIV, VHC o Helicobacter Pylori en donde los anticuerpos dirigidos presentan reacción cruzada con la glicoproteína IIIa plaquetaria.

PATOGENESIS

La sobrevida plaquetaria es reducida a consecuencia del aclaramiento plaquetario por anticuerpos, mediante los macrófagos tisulares, en esencialmente todos los pacientes. Evidencia acumulada de estudios de cinética plaquetaria también apuntan hacia una supresión inmune de megacariocitos y plaquetas en desarrollo en muchos pacientes. Así también se ha observado apoptosis de megacariocitos y supresión de la megacariopoyesis in vitro por plasma/IgG o células T de pacientes con TIP; y existe respuesta a agonistas del receptor de Trombopoyetina.

Los anticuerpos reactivos a plaquetas no son detectados en todos los individuos con TIP, y un subgrupo de pacientes no responde a la terapia farmacológica o quirúrgica, que permite la supresión de la célula B o inhiben el aclaramiento plaquetario, sugiriendo otros mecanismos patogénicos tales como apoptosis mediada por anticuerpos, cambio antigénico, y destrucción plaquetaria o supresión medular mediada por células T.

Los macrófagos en la TIP

Los Macrófagos juegan un rol importante en la respuesta inmune adaptativa, al fagocitar partículas infecciosas mediante receptores de complemento y los receptores gamma Fc (FcγR).⁵ A partir de que la fagocitosis es frecuentemente acompañada de liberación de citoquinas inflamatorias y especies reactivas de oxígeno que condicionan daño tisular existe una estrecha regulación del proceso fagocítico. Hasta el momento se conocen muchos eventos moleculares iniciados por los FcγR, sin embargo la regulación de este proceso de activación no es clara.

Los macrófagos expresan tres clases de FcγR: I, II y III.⁶ Los seres humanos expresamos dos formas diferentes de FcγR II: FcγR IIa y FcγR IIb, productos de 2 diferentes genes.

FcγR I, III y IIa son receptores activadores asociados con los Inmunorreceptores basados en tirosina con motivo activador (ITAM; Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs)⁷ los cuales se encuentran presentes en la porción citoplásmica de estos FcγR⁷ o con las subunidades FcR de bajo peso molecular⁸. En contraste FcγR IIb es un receptor inhibitorio que tiene en su dominio citoplásmico un inmunorreceptor basado en tirosina con motivo inhibitorio (ITIM; immunoreceptor based tyrosine inhibition motif). Los dominios extracelulares de FcγR IIa y IIb son virtualmente idénticos, lo cuál ha dificultado el estudio de FcγR IIb en macrófagos humanos.^{9,10} La función de FcγR IIb se involucra con regulación a la baja del proceso fagocítico condicionado por partículas cubiertas con IgG,^{11,12} esto se lleva a cabo usando una molécula efectora que contiene un dominio de homología Src 2 (SH2) la cual contiene una fosfatasa de inositol polifosfato (SHIP; Src Homology 2 domain-containing inositol polyphosphate phosphatase)^{13,14}.

En conclusión, los macrófagos juegan un papel efector en la TIP, debido a su papel teórico en la fagocitosis plaquetaria. Sin embargo el estudio de esta serie celular, hasta el momento, han sido observaciones murinas realizadas por Mckenzie y colaboradores en ratones transgénicos Knockout para FcγR IIa y FcγR III, sin trombocitopenia a pesar de la presencia de anticuerpos IgG contra plaquetas.¹⁵ Faltan aun estudios para definir significancia clínica de tales observaciones en la TIP.

Los Linfocitos T y la TIP

A pesar de que en la patogenía de la TIP podrían estar involucrados principalmente los linfocitos B, actualmente se han apreciado que los Linfocitos T juegan un papel más importante en este proceso autoinmune. Los pacientes con TIP presentan activación anormal de linfocitos así como la producción citoquímica mediada por TH1 y TH 2. En adición a ello la Lisis mediada por células citotóxicas de plaquetas autólogas se encuentra incrementada en TIP activa, así también existe incremento en las células T CD8+ con sobreexpresión de Granzima B y genes Perforina. ¹⁶⁻¹⁹

Los receptores de células T (TCR) son Heterodímeros consistiendo en cadenas α/β o γ/δ . Los genes que codifican los dominios variables de las cadenas Heterodimericas TCR α y β son TRA(Cadena α) y TRB (Cadena β), los cuales son ensamblados por recombinación somática de las regiones Variable(V), de Diversidad(D, solamente en cadenas β) y de Unión(J); además de ello cuentan con tres regiones hipervariables, también denominadas regiones de determinación complementaria (CDR 1, CDR2, CDR3) de las TCR. ²⁰ CDR3 esta envuelta en la respuesta a la interacción específica con el péptido antigénico. Al igual que los Genes TRA y TRB, los genes TRG y TRD se rearreglan específicamente en las Células T γ/δ +, y consisten en en regiones Variable(V), de Diversidad (D, solamente para TRD) y Unión (J); lo cuales deben ser recombinados durante la diferenciación T. ²¹⁻²³ El locus genico humano del TRG se encuentra localizado en la banda 7p15 del cromosoma 7, a diferencia del Locus del Gen TRD el cual es localizado en el cromosoma 14, al igual que el locus del gen TRA. El gen TRG contiene al menos 14 regiones variables reconocidas(TRGV) los cuales se han clasificado en 4 subgrupos(TRGV I- IV) y

los TRD contienen al menos ocho segmentos funcionales variables (TRDV), por lo cual son subdivididos en ocho subfamilias (TRDV 1 - 8)^{21- 27}.

El repertorio de TCR provee un panorama global de la distribución por subfamilias, así como la expansión clonal de Celulas T $\alpha\beta$ / $\gamma\delta$ + de diferentes patologías. Expansión Oligoclonal de celulas T TRBV han sido encontrados en enfermedades reumatológicas tales como artritis reumatoide y Lupus Eritematoso Sistémico.²⁸⁻³⁰ Una expresión y expansión clonal de linfocitos T con expresión frecuente de TRBV 3, 6, 10, 13, 14 y 21 han sido observados en TIP; y estas observaciones se revirtieron después del Uso de Rituximab.³¹⁻³⁴

TIP y Helicobacter Pylori

Se ha Asociado Helicobacter Pylori, con la presencia de formas crónicas refractarias de la TIP; así también el tratamiento erradicador de Helicobacter Pylori se ha asociado a restauración del conteo plaquetario hasta en 67.74% de los pacientes a partir de observaciones de Wu y cols.³⁵

ASPECTOS CLINICOS DE LA TIP

Muchos de los adultos presentan historia de purpura prolongada. En la serie de casos de Cortelazzo y colaboradores (1991)³⁶, aprecio que un tercio de los pacientes presentaron conteos superiores a 30×10^9 / L, estos no fueron tratados, y no hubieron síntomas de hemorragia significativa durante 30 meses de observación.

La historia clínica y el examen físico son normales excepto por los signos y síntomas de hemorragia. Las petequias son asintomáticas, no palpables, su distribución puede ser influenciada por la dureza del tejido, siendo no apreciada en palmas de manos y planta de los pies y mucho más en membranas mucosas donde las bulas hemorrágicas ocurren con trombocitopenia severa. Dentro de las manifestaciones hemorrágicas la purpura. Menorragia, epistaxis y gingivorragia

son comunes; hemorragia gastrointestinal y hematuria son poco comunes. La hemorragia intracerebral no es común, pero es la causa de muerte más importante en este tipo de pacientes. Los síntomas hemorrágicos son raros a menos que la cifra de plaquetas sea inferior a $10 \times 10^9/L$, y a esta cifra plaquetaria los pacientes no experimentan hemorragia mayor. Un bazo palpable sugiere que la TIP no es causa de la trombocitopenia; sin embargo hasta un 3% de ellos pueden presentar bazo palpable a la exploración física y por peso posterior a esplenectomía, esto concuerda con el 2.9% de frecuencia apreciado en jóvenes sanos quienes no presentan enfermedad durante el seguimiento a largo plazo.³⁷

CARACTERISTICAS DE LABORATORIO²

La trombocitopenia aislada es la anormalidad esencial observada. Se puede llegar a observar eosinofilia, pero esta observación es más común en niños. El volumen plaquetario se encuentra incrementado y se ha correlacionado con la producción plaquetaria acelerada; sin embargo la observación de plaquetas con tamaño parecido al de los glóbulos rojos sugieren la presencia de trombocitopenia congénita. Los estudios de coagulación son normales, y el tiempo de sangrado no provee información útil. Existe incremento medular de megacariocitos con un cambio hacia formas jóvenes, poco poliploides y poco maduras. Los anticuerpos antiplaquetarios no son útiles para definir el diagnóstico.

DIAGNOSTICO Y DIAGNOSTICO DIFERENCIAL^{1,2}

La TIP es un diagnóstico de exclusión de trombocitopenia de causas no autoinmunes y causas secundarias de trombocitopenia inmune. En particular las trombocitopenias congénitas se deben tener en mente en trombocitopenias aisladas, porque la diferenciación con TIP puede ser difícil si no contamos con

conteos plaquetarios previos y el estudio de miembros de la familia. Así también otras condiciones clínicas causantes de trombocitopenia inmune que pueden mimetizar a la TIP son los síndromes mielodisplásicos, carcinoma metastásico a bazo y coagulación intravascular diseminada. Las causas secundarias de Trombocitopenia inmune corresponden a un 20% de las trombocitopenias inmunes en los Estados Unidos. La más común es la trombocitopenia secundaria a LES.

Existen recomendaciones para la evaluación inicial de los pacientes con sospecha de TIP ; en la evaluación básica se debe realizar una buena historia clínica que incluya historia familiar y exploración física, los estudios de laboratorio a realizar son biometría hemática completa, conteo reticulocitario, frotis de sangre periférica, uantificación de inmunoglobulinas, evaluación de la médula ósea (en pacientes seleccionados), grupo sanguíneo (Rh), prueba de antiglobulina directa, determinación de infección por H Pylori, HIV y VHC; Entre los estudios de utilidad potencial se encuentran la determinación de anticuerpos antiplaquetas específicos para las glicoproteínas, anticuerpos antifosfolípidos, anticuerpos antitiroideos y pruebas de función tiroidea, prueba de embarazo en mujeres con sospecha de ello, anticuerpos antinucleares, PCR para parvovirus y CMV; las pruebas de beneficio incierto enunciadas en dichas recomendaciones son la cuantificación de trombopoyetina, plaquetas reticuladas, Inmunoglobulina G asociada a plaquetas, estudio de supervivencia plaquetaria, tiempo de sangrado y cuantificación del complemento.

HISTORIA NATURAL¹

No existen estudios observacionales de pacientes adultos con TIP sin tratamiento, porque los pacientes generalmente presentan hemorragia que requiere intervención. Los resultados a largo plazo en adultos tratados de manera inicial

con prednisona oral diaria suplementada con inmunoglobulina G o anti RhD intravenosa son difíciles de definir, con estimaciones de pacientes que no requieren terapia adicional en rangos de 5% al 40%. Algunos pacientes que han requerido terapia intensa por años pueden desarrollar mejoría con el tiempo. En general la pérdida de respuesta y la duración de la enfermedad se incrementan. Sobre esto el International Working Group subdivide a los pacientes basados en la duración de la enfermedad usando los términos “de nuevo diagnóstico” para la enfermedad con menos de tres meses de diagnóstico, “persistente” para la enfermedad por más de 3 a 12 meses, y “crónicos” a quienes tienen más de 12 meses de enfermedad.

TRATAMIENTO^{1,2}

El tratamiento de la TIP debe ser individualizado. El objetivo principal del tratamiento es proveer un conteo plaquetario hemostático por arriba de 30×10^9 plaquetas/L. El tratamiento es raramente indicado si el conteo plaquetario se encuentra por arriba de esta cifra en la ausencia de disfunción plaquetaria u otro defecto hemostático, cirugía, trauma, uso concomitante de anticoagulantes orales, o en aquellos cuyo estilo de vida predispone al daño.

La respuesta en TIP se define a partir de lo expuesto por el IWG, en respuesta completa cuando se alcanza conteo plaquetario arriba de $100 \times 10^9/L$; respuesta parcial cuando la cifra plaquetaria se encuentra entre 30 a $100 \times 10^9/L$; y sin respuesta si la cifra plaquetaria es inferior a $30 \times 10^9/L$. Algunos artículos mencionan el término Remisión completa cuando se alcanzan cifras plaquetarias por arriba de $150 \times 10^9/L$.

La primera línea de Tratamiento actual son los corticosteroides, complementado con Inmunoglobulina G o anti Rh(D) si es necesario, con el fin de detener las manifestaciones hemorrágicas e incrementar la cifra plaquetaria por arriba de 30

a 50×10^9 / L en pacientes de reciente diagnóstico. El Corticosteroide ampliamente recomendado es la Prednisona Oral a dosis de 1 mg/ kg/d. Sin embargo, se han publicado el uso de Dexametasona oral en 4 días a dosis de 40mg/ día como unico ciclo demostrando respuesta sostenida hasta en 50% de los pacientes con diagnóstico de novo. En otro estudio la dexametasona oral administrada a estas dosis en 4 ciclos totales cada 14 días genero un 86% de respuesta, con respuesta completa del 74% de ellos a 8 meses. Son necesarios estudios aleatorizados para validar la superioridad de una terapia agresiva sobre la prednisona. Entre otras opciones de tratamiento de primera linea se encuentran la combinacion de Dexametasona con anticuerpos antiCD20(Rituximab) lo cual demostró altas tasas de respuesta y duración de esta que aquellos tratados con unico ciclo de dexametasona.

La Terapia de segunda linea surge a partir de la toxicidad acumulativa asociada con uso prolongado de corticosteroides, minimizando la exposición esteroide una vez que se alcanza la respuesta con la terapia esteroide. Modalidades alternativas de tratamiento deben ser instituidos en la ausencia de respuesta a pesar de un mes de tratamiento o en su caso existan datos de toxicidad asociada al uso de esteroide. Ocasionalmente los pacientes responden a dosis bajas de esteroides; asi también el Danazol solo o en combinación con azatioprina y dapsona han sido usados como fármacos ahorradores de esteroides. Las opciones de manejo de segunda linea recomendadas son la realización de esplenectomia, el uso de anti CD20 y el uso de agonistas del receptor de trombopoyetina.

La esplenectomia ha sido por decadas el estándar de manejo para los pacientes con TIP no respondedores o intolerantes a la prednisona. Dos tercios de los pacientes presentan respuesta completa a largo plazo. El resto de los pacientes

pueden presentar respuesta parcial o no responden a la esplenectomía, sin embargo la cifra plaquetaria por lo regular es hemostática y no requieren de terapia adicional. Se recomienda la realización de esplenectomía laparoscópica dada su menor morbilidad y mortalidad asociada en relación a la realizada por laparotomía. Se recomienda vacunas contra patógenos encapsulados 2 semanas previas a la esplenectomía, principalmente contra neumococo ya que el sitio primario de reconocimiento inmune de este tipo de patógenos es el bazo. Las tasas de respuesta son bajas en pacientes de edad avanzada, no existen predictores de respuesta, a excepción apreciar el aclaramiento esplénico con marcaje plaquetario con In111, el cual no es accesible en muchos centros..

Un único ciclo de Rituximab a dosis de 375mg/m² administrada cada semana por 4 semanas, induce respuesta completa en aproximadamente 40% de los pacientes a un año, un tercio después de 2 años , y 15 a 20% a 5 años. La respuesta mínima inicial se aprecia a las dos semanas, siendo esta máxima de 4 a 6 meses después del tratamiento. Aquellos que han presentado remisión completa y posteriormente recaen responden a retratamiento. El rituximab se contraindica en pacientes con VHB activa. Dentro de las complicaciones a largo plazo destacan la asociación con leucoencefalopatía multifocal progresiva. Faltan aun muchos estudios clínicos para definir la seguridad de este fármaco así como observar los factores de riesgo asociados a esta última patología mencionada.

Los agonistas del receptor de trombopoyetina, eltrombopag y romiplostim, han sido aprobados por la FDA para su uso en pacientes con TIP que requieren tratamiento después de un curso inicial con esteroides. En algunas partes del mundo se utiliza en pacientes que requieren terapia después de esplenectomía. Con el romiplostim se ha observado alcanzar cifras plaquetarias por arriba de 50 x 10⁹/L , sin terapia adicional, principalmente en pacientes no esplenectomizados

(61% vs 38%), su uso sostenido se ha observado por 5.5 años, sin embargo su discontinuación involucra pérdida de la respuesta obtenida.

FcγR IIb (CD 32b)

FcγR IIb y Leucocitos

Como comentamos previamente en la sección de Macrófagos y TIP, al activarse la molécula CD 32b produce la activación ITIM en su dominio intracitoplásmico con el objetivo de reclutar y activar a SHIP a nivel intracelular³⁸, lo cual condiciona los siguientes cambios fisiocelulares:

- Regula negativamente la activación y proliferación de las Células B inhibiendo la producción IgG.³⁹
- En monocitos y macrófagos condiciona regulación a la baja de la fagocitosis mediada por FcγR IIa (CD 32 a) y FcγR IIIa (CD 16a).^{40,41,42}
- Modula a la baja la activación de la células plasmáticas por el Receptor de alta afinidad IgE FcR.^{43,44}
 - En las células dendríticas presenta una doble función. Por una parte al interferir con la activación de las señales mediadas por FcγR IIb se incrementa la maduración e inmunogenicidad de los precursores de las células dendríticas mieloides (CDm).⁴⁵⁻⁴⁷ Por otra parte algunos estudios sustentan que la activación de FcγR IIb en células dendríticas maduras promueve una respuesta humoral independiente de células T, al presentar antígenos nativos a las células B; de tal forma que la expresión de FcγR IIb en células dendríticas foliculares facilita la respuesta por las células B.

FcγR IIb y Enfermedades Reumatológicas

Existe evidencia de que el grado de activación del FcγR IIb es indispensable para la inducción de inmunotolerancia o autoinmunidad. Los ratones deficientes en el gen FCGR2B sin expresión de FcγR IIb presentan niveles elevados de Inmunoglobulinas y respuestas anafilácticas incrementadas.⁵⁰ Así también este tipo de ratones desarrollan Anticuerpos antinucleares, Glomerulonefritis y otros síntomas semejantes a lupus.⁵¹ Acorde a ello, polimorfismos naturales en el promotor del gen FC GR2B de raton, que condicionan una expresión reducida de este receptor, han sido identificados en muchas cepas de ratones con características autoinmunes.^{52, 53, 54} Es de Interes que si se llega a expresar 40% mas el FcγR IIb en células B, mediante tecnicas retrovirales, es suficiente para restaurar la tolerancia y prevenir la autoinmunidad en estas cepas de ratones.⁵⁵

En humanos el gen FCGR2B es localizado en el cromosoma 1q23.⁵⁶ Su polimorfismo se ha asociado con el fenotipo de lupus eritematoso sistémico.⁵⁶⁻⁶¹ Kainghso y cols demostraron que los polimorfismos en la region regulatoria de FCGR2B forman dos haplotipos mayores, y el que es menos frecuente el haplotipo 2B4 es significativamente sobreexpresado en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico.⁶²

Parte del modelo fisiopatológico del Lupus Eritematoso sistémico ha llevado al entendimiento de que la expresión del receptor FcγR IIb se encuentra disminuida en la serie de células dendriticas y monocitos de sangre periférica, así también existe reducción en la cantidad de este marcador en las Células B Maduras y Plasmablastos. Siendo probable definir en algún futuro usar vías por las cuales la expresión de esta molécula se incremente para el manejo de esta patología.⁶⁵

Otra patología asociada a disminución en la expresión de CD 32b es la Artritis reumatoide activa y no activa en relación a los controles sanos.⁷²

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Como parte de nuestro entendimiento en la fisiopatogenia de la TIP, tenemos las siguientes preguntas de Investigación: ¿Cuál es el nivel de expresión del FcγR IIb(CD32b) en pacientes con TIP?, a partir de esta respuesta ¿ existe alguna asociación entre el nivel de expresión del FcγR lib (CD 32b) y el conteo de plaquetas de los pacientes con TIP? ¿como se encuentra La expresión de CD 32b en pacientes con TIP en relación a la población general?

La TIP es una entidad clinica que requiere para su diagnóstico el descartar otras patologías que pudieran ser origen de la Trombocitopenia. Si bien, aparte del costo condicionado para el escrutinio diagnóstico, la sospecha de diagnóstico de TIP se da mediante clínica la derivada del FSP, y apreciar destrucción periferica de plaquetas ,en ausencia de una patologia condicionante de trombocitopenia. El advenimiento de técnicas moleculares mediante citometria de flujo ha permitido el entendimiento de patologias autoinmunes, tal como el LES , en donde se han realizado observaciones como la reducción en la expresion de CD 32b en Linfocitos B de memoria y plasmablastos.

Desde su descripción, han existido muchos avances respecto a el manejo médico iniciado en este tipo de pacientes. Sin embargo el pronóstico en adultos es variable respecto a la cronicidad o refractariedad. De tal forma que en algunos de ellos, a pesar de la esplenectomía, presentan un aclaramiento plaquetario elevado condicionando formas clinicas crónicas o refractarias.

El presente proyecto se justifica ante la necesidad de definir un marcador diagnóstico y/o pronóstico para esta patología que afecta a 3.3×10^5 personas adultos por año⁶⁷, y en la que los costos para su diagnóstico por exclusión y manejo con nuevas terapias, suelen ser muy alto.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Observar y describir la expresión de CD 32b en pacientes con TIP.

OBJETIVO GENERAL:

Medir la Expresión del FcγR IIb (CD 32b) en Linfocitos B de Sangre periférica en pacientes con TIP, en el servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Cuantificar la expresión de FcγR IIb (CD 32b) en Linfocitos B de sangre periférica de pacientes con TIP activa ($< 100 \times 10^9$ plaquetas/L).

Cuantificar la expresión de FcγR IIb (CD 32b) en Linfocitos B de sangre periférica de pacientes con TIP No activa ($\geq 100 \times 10^9$ plaquetas/L).

Asociar el nivel de expresión del FcγR IIb (CD 32b) Linfocitos B de sangre periférica con el conteo plaquetario de los pacientes con TIP

HIPOTESIS GENERALES

El porcentaje de expresión del FcγR IIb (CD 32b) se encuentra disminuida en Linfocitos B de sangre periférica en pacientes con TIP Activa

El porcentaje de expresión del FcγR IIb (CD 32b) en Linfocitos B de sangre periférica se relaciona de manera directa con el conteo plaquetario de los pacientes con TIP

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio Observacional, De casos y controles, Transversal, Descriptivo donde se incluirán todos los pacientes ingresados o en seguimiento en el Servicio de Hematología del H. Especialidades del Centro Médico Nacional SXXI, serán sujetos de este estudio los ingresos de primera vez y los subsecuentes, con diagnóstico de Trombocitopenia inmune primaria.

UNIVERSO DE TRABAJO

Todos los pacientes del Servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI con diagnóstico de Trombocitopenia inmune primaria

DESCRIPCIÓN DE VARIABLES

Variable Independiente: Pacientes con trombocitopenia inmune primaria

Variable Dependiente: expresión de CD 32b

DEFINICION Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Cuadro 1. Definición y operacionalización de Variables				
VARIABLE	DEFINICIÓN	OPERACIONALIZACIÓN		
Trombocitopenia Inmune Primaria	Pacientes con cifra de plaquetas por debajo de 100,000, confirmada por Frotis de Sangre Periferica y/o cuantificación de plaquetas con heparina o citrato, aunado a presencia de cuenta de megacariocitos normal (2 a 4 por campo de alto poder) o aumentada (mayor de 4 megacariocitos por campo de alto poder) Observados en Frotis de Médula Osea y confirmados por Biopsia de Hueso. Con Pruebas de Funcionamiento Hepático Normales, Marcadores Inmunológicos normales, Panel viral VIH, VHB Y VHC Negativos.	ACTIVA	Menos de 30,000 plaquetas/microlitro(sin respuesta, en recaída o de novo)	Plaquetas/microlitro
			Mas de 30,000 pero menos de 100,000 plaquetas por Microlitro o elevación al doble de la cifra plaquetaria inicial (respuesta parcial)	Plaquetas/microlitro
		NO ACTIVA	Mas de 100,000 plaquetas/microlitro o (respuesta completa)	Plaquetas/microlitro
Expresión de FcγR IIb(CD 32b)	Cuantificación del porcentaje de expresión de la molécula CD32b en la membrana celular de Monocitos, Celulas dendríticas y Células B de sangre periférica mediante citometria de flujo.	Expresión FcγR IIb(CD 32b) en Linfocitos B(CD19 +)	Porcentaje de expresión e IMF FcγR IIb(CD 32b) por célula	

CRITERIOS DE SELECCIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes mayores de 16 años.
- Con diagnóstico de Trombocitopenia Inmune Primaria

CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN

- Pacientes que no tengan abordaje previo de TIP en la unidad.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- A) Pacientes portadores de Hepatopatía crónica terminal
- B) Pacientes con Síndrome Mielodisplásico Asociado
- C) Pacientes con Neoplasias Asociadas
- D) Pacientes con Trombocitopenia Inmune secundaria Documentada
- Pacientes con Padecimientos Reumatológicos asociados
- Pacientes con infección por HIV
- Pacientes con Infección por VHB
- Pacientes con infección por VHC
- E) Pacientes con Hemoglobina menor a 10 gr/ dl
- F) Pacientes con antecedentes de Trombosis
- G) Pacientes con Uso de Anticonceptivos Hormonales Orales
- H) Pacientes con Insuficiencia Renal Crónica Terminal

PROCEDIMIENTOS

Inicialmente se identificarán a los pacientes con Purpura Trombocitopénica Inmune del servicio de Hematología con previa lectura y recolección de datos de expediente clínico Institucional. A partir de este rubro se tomará la muestra sanguínea ya sea en la consulta externa o en hospitalización del servicio de

Hematología. A los pacientes con Purpuras Trombocitopénicas Inmunes de Novo o en recaída captados por Admisión continua se les tomaron muestras

OBTENCION DE LAS MUESTRAS

Se tomo una muestra de 10 ml de sangre con anticoagulante EDTA de 31 pacientes con TIP y 21 controles sanos, se obtuvieron las células mononucleares (CMN) por un gradiente de ficoll hypaque. Las CMN se congelaron en solución crioprotectora (10% DMSO y 90% SFB) y se mantuvieron a -70°C hasta su uso.

El día de la toma de Muestra se consideró el día de corte para el análisis clínico del caso de los pacientes con TIP.

TINCION PARA CITOMETRIA DE FLUJO

El día del experimento se descongelaron las muestras en medio RPMI, se hizo conteo celular con un hematocitometro y determinación de la viabilidad con azul tripano.

Se tomo una muestra de las CMN de cada uno de los pacientes y controles (aproximadamente 2×10^5 células) y se tiñeron para inmunofluorescencia para ver la expresión del receptor Fc γ RIIB en las poblaciones de linfocitos B y NK. El anticuerpo para el receptor FC γ RIIB es un anticuerpo policlonal de conejo donde el inmunógeno corresponde a residuos en el C-terminal del Fc humano RIIB, Novus biological NB100-79947, para revelar este anticuerpo se uso un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a FITC de Jackson Immuno Research 711-096-152. El anticuerpo usado para teñir los linfocitos B fue CD19 conjugado a Ficoeritrina de e-Bioscience 12-0199-42 y el anticuerpo para teñir a las células NK fue el CD56 conjugado a APC de BD 555518. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur de Becton and Dickinson.

ANALISIS DE LAS MUESTRAS

El análisis de las muestras se realizó con el programa de FlowJo: En un dotplot de Forward vs Side Scatter (SSC) se marco la región de linfocitos y de esta región se hizo otra ventana de SSC vs CD19 donde se seleccionó la población CD19+, en esta

población CD19+ se analizó la expresión del receptor Fc γ RIIB. Este mismo análisis se realizó para seleccionar la población CD56+.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las características generales de la población estudiada será analizada con estadística descriptiva utilizando frecuencias, porcentajes, medianas, promedios. Para el análisis de correlaciones se utilizara métodos estadísticos no paramétricos tales como la r de spearman, La prueba de Mann Whitney, así como para más de 3 grupos la prueba de Kruskal Wallis. La p significativa a 2 colas es cuando esta es menor a 0.05.

Para el análisis estadístico del grupo de pacientes con TIP, los pacientes se acomodaron en 5 grupos clínicos, a partir de lo observado al corte. El primero de ellos acomoda a los pacientes en grupos de Respuesta a partir de los criterios del IWG en pacientes con Respuesta completa, Con respuesta Parcial y Sin Respuesta. El segundo acomoda a los pacientes en base al uso o no de esteroides, teniendo como definición el uso de no esteroides a aquellos pacientes con más de 1 mes sin su uso. El tercer grupo los acomoda en TIP activa y no activa a partir del conteo plaquetario, definiendo al paciente TIP activo aquel que cuenta con menos de 100×10^9 plaquetas/L. El cuarto grupo los acomoda a partir de la evolución clínica presentada, aquí se define paciente con TIP de novo aquel quien reúne el criterio de trombocitopenia inferior a 100×10^9 plaquetas/L, tiene destrucción periférica de plaquetas; TIP en recaída la definimos como la pérdida de respuesta parcial o completa, de un paciente ya conocido con TIP; TIP crónica no activa aquel con más de 3 meses de evolución, con una o más recaídas, que alcanzó respuesta completa en algún momento de su evolución clínica y se encuentra con cifras al corte igual o mayor a 100×10^9 plaquetas/L; TIP crónica Activa aquel con más de 3 meses de evolución, que ha alcanzado o no Respuesta completa en algún momento de su evolución clínica y se encuentra con cifras al corte inferior a 100×10^9 plaquetas/L; TIP refractaria aquel paciente esplenectomizado y que presenta cifra plaquetaria inferior a 100×10^9

plaquetas/L. El quinto grupo acomoda a los pacientes en aquellos que han sido esplenectomizados o no al corte.

Nos apoyamos para el análisis estadístico con los programas Excel, SPSS 17.0 y Graphpad Prism 5.

RECURSOS PARA EL ESTUDIO

RECURSOS HUMANOS:

Médicos adscritos al Servicio de Hematología del CMN SXXI

Médicos residentes del Servicio de Hematología del CMN SXXI

Se nos apoyó por parte de la unidad de Investigación en Inmunología dirigida por la Dra Bonifaz MD para la realización de este proyecto. La separación de la muestra en Ficoll, la criopreservación y la lectura en el citometro de flujo se realizará en dicha unidad con apoyo del personal a su cargo.

RECURSOS INTERNACIONALES:

Archivo Clínico

RECURSOS MATERIALES:

Expediente Clínico de cada paciente.

Se utilizaron recursos personales para compra del anticuerpo monoclonal CD32b manejado por Novus Biologicals. El procesamiento en Ficoll, La criopreservación y Los fluorocromos utilizados fueron realizados por la Unidad de Investigación en Inmunología del CMN S XXI.

ASPECTOS ÉTICOS:

Serán revisados los expedientes clínicos, dicha información será manejada de manera confidencial.

CRONOGRAMA:

Revisión de expedientes y Recolección de Datos: 27 abril al 22 de diciembre 2010.

Análisis de Resultados: Enero del 2011.

Tabla 2. Analisis de Características generales de la población con TIP estudiada		
Característica	Numero de pacientes (n=31)	Análisis Porcentual (Σ = 100%)
Sexo	Masculino=8 Femenino = 23	M= 26% F= 74%
Edad	Minima 18 años Maxima 90 Años	Mediana 46 años Media : 48.09 DE 20.91
Distribucion en Grupos de respuesta a partir de conteo plaquetario. ¹	TIP sin respuesta= 7 TIP en respuesta parcial= 14 TIP en respuesta completa= 10	TIP SR= 22.58% TIP RP= 45.16% TIP RC= 32.26%
Distribución en Grupos de Pacientes con esteroides y sin esteroides al momento de la toma de muestra. ²	TIP con esteroide= 17 TIP sin esteroides= 14	TIP con esteroide= 54.84% TIP sin esteroide= 45.16%
Distribución en Grupos a partir de actividad de TIP definidas a partir del conteo plaquetario. ³	TIP Activa= 21 TIP No activa= 10	TIP activa= 67.74% TIP No activa= 32.26%
Distribucion en grupos a partir de la evolución clínica al momento del estudio. ⁴	TIP de Novo= 9 TIP en Recaida= 6 TIP Cronica no activa=6 TIP Cronica Activa= 8 TIP Refractaria = 2	TIP de novo= 29.03% TIP en Recaida= 19.35% TIP cronica no activa= 19.35% TIP Cronica Activa= 25.81% TIP Refractaria= 6.46%
Distribución en Grupos a partir de la presencia o no de esplenectomia.	TIP no esplenectomizados= 26 TIP esplenectomizados= 5	TIP no esplenectomizado= 83.87% TIP esplenectomizado= 16.13%
Comorbilidades	Sin comorbilidades= 16	Sin comorbilidades= 51.61%

	1 comorbilidad= 6 2 comorbilidades=5 3 o mas comorbilidades=4	Con 1 o 2 comorbilidades= 35.48% Con mas de 3 comorbilidades= 12.90%
Lineas de Tratamiento actual	Sin Tratamiento= 7 1 Linea de Tx= 12 2 Lineas de Tx= 7 3 lineas de Tx= 4 4 Lineas de Tx=0 5 Lineas de Tx= 1	Sin tratamiento= 22.58% 1 o 2 Lineas de Tx= 61.29% Mas de 3 Líneas de Tx= 16.13%
Lineas de Tratamiento Previas (n= 22) ⁵	1 Linea de Tx= 3 2 Lineas de Tx= 9 3 Lineas de Tx= 6 4 Lineas de Tx= 3 5 Lineas de Tx= 0 6 Lineas de Tx= 1	1 o 2 Líneas de Tx= 54.54% 3 o 4 Líneas de Tx= 40.91% 5 o 6 Líneas de Tx= 4.55%
<p>¹ Grupos de respuesta a partir de los criterios del International Working Group: Sin respuesta menor a 30×10^9 plaquetas/L , En respuesta parcial de 30 a 100×10^9 plaquetas/10^9 plaquetas/L y en respuesta completa mayor de 100×10^9 plaquetas/L.</p> <p>² Los pacientes sin esteroide tienen mas de 1 mes sin administración.</p> <p>³ TIP activo se define aquellos con conteo plaquetario inferior a $100 \times 10^9/L$. TIP No activa aquellos con conteo plaquetario mayor o igual a $100 \times 10^9/L$</p> <p>⁴ Ver Texto, Analisis en Material y Métodos</p> <p>⁵No se incluyen a los pacientes de novo</p>		

El predominio por genero fue en el femenino (74%). La edad mediana de los pacientes fue de 46 años.

La mayoría de los pacientes no presentaba comorbilidades 51.61%. La comorbilidad mas frecuente fue la DM2 en 8 pacientes, seguida de la HAS en 6 pacientes; La coexistencia DM2-HAS se dio en 3 pacientes. Se documentaron 3 pacientes con hipotiroidismo sustituido dos de ellos de tipo primario y uno de tipo subclinico. Dos de los pacientes diabéticos tenían comorbilidad con hipotiroidismo, uno primario y uno subclinico, el primero de ellos también presentaba HAS. Se apreciaron 2 pacientes con nefropatia estadios 3 y 4, este ultimo asociado a DM2 y el primero de origen no determinado. Dos de los pacientes fueron neumópatas crónicos, uno de los pacientes fue cardiopata asociado a neumopatia e Hipertensión Arterial sistémica (Gráfica 1).

Respecto a la administración de Fármacos la mayoría de los pacientes tenía 1 o 2 líneas de tratamiento al momento de corte (61.29%) incluyendo a los pacientes de Novo. Así también previamente ya se habían usado 1 o 2 líneas de Tratamiento (54.54%), Sin tomar en cuenta a los pacientes con TIP de novo ya que ellos previamente eran considerados sanos.

El porcentaje de expresión y la IMF de CD 32b, así como las Biometrias hemáticas al corte en todos los pacientes con TIP se expresan en la tabla 3. En esta se ordenan los 31 pacientes por número de folio secuencial.

Tabla 3. Porcentaje de expresión e IMF de CD32b y Biometría Hemática++ completa al corte, por paciente con TIP

Paciente TIP (Folio)	% CD 32b*	IMF CD32b*	IMF CD 32b**	Hemoglobina	Leucocitos	Neutrofilos	Plaquetas
1	51	32.3	43.6	14.1	7.3	4.39	76
2	39.5	22.7	36.2	15.3	8.3	4.25	134
3	49.2	39.2	90.7	11.8	5.9	2.27	67
4	45.8	32.9	74.6	13.8	6.7	4.3	60
5	42.2	24.1	51	12.3	7.7	5.44	16
6	78.6	67.9	121	11.8	7.7	4.51	268
7	68.5	45.7	72.4	13.9	3.7	1.44	45
8	71.3	46.9	73.3	9.7	6.5	5.12	123
9	48.2	37.4	45.5	13.6	7	3.43	78
10	56.4	42	4.98	17.1	6.6	3.97	108
11	50	26.7	31.3	14.6	8.1	5.3	185
12	35.6	18.9	24.5	16.6	7.1	3.7	203
13	37.7	25.4	37.4	16.1	4.6	2.48	119
14	54.9	34.5	50.6	12.4	16.79	13.02	11
15	53.6	27.3	37.7	17.3	4.7	2.46	1
16	42	28.7	43.3	15.2	8.5	4.45	14
17	56.9	30.9	54.4	14.9	9.2	6.56	46
18	51	26.4	53	15.6	5.4	2.73	126
19	51.6	34	43.9	17.8	5.6	3.09	33
20	58.1	37.4	48.1	11.2	10.4	6.08	227
21	61.1	32.6	57.4	10.7	13	10.02	39
22	50.2	27.6	41	12.3	7.06	3.64	17
23	47.4	28.9	120	12.2	9.2	4.8	57
24	44.6	22.8	37.5	14.8	6.4	5	4
25	47.7	20.4	27.9	14.2	4.6	1.88	338
26	37.8	21	39.8	13.9	10.5	9.36	72
27	48.1	25.8	51.7	14.3	9.8	8.47	2
28	47.5	28.1	42.3	9.9	17.8	13.36	93
29	33.6	22.4	50.3	16.1	9.4	7.02	83
30	37	22.8	42.9	11.2	18.2	14.4	66
31	56.1	32.7	38.2	9.4	8.2	5.52	45

* En región de Linfocitos B(CD 19+). ** En región de Monocitos. ++Hb=Gr/dl, Leu x 10³/microlitro, Neu x 10³ / microlitro, Plaquetas x 10³/L

En la Tabla 4, se aprecia la distribución de los pacientes en TIP activa y No activa, su porcentaje de expresión e IMF de CD 32b en la región de Linfocitos B, así como el IMF de CD 32b en Linfocitos B(CD 19+) en la región de Monocitos. Al correlacionar con r de Spearman se apreció significancia estadística en la p a dos

colas de la IMF de 0.03, siendo esto no apreciado en la prueba de Mann-Whitney en donde se aprecio p de 0.8326(ver tabla 5).

Tabla 4. Distribucion de pacientes en TIP activa y No Activa				
Pacientes con TIP Activa (Menos de 100×10^9 plaquetas/L)				
Folio	Plaquetas $\times 10^9/L$	% CD 32b*	IMF CD32b*	IMF CD 32**
15	1	53.6	27.3	37.7
27	2	48.1	25.8	51.7
24	4	44.6	22.8	37.5
14	11	54.9	34.5	50.6
16	14	42	28.7	43.3
5	16	42.2	24.1	51
22	17	50.2	27.6	41
19	33	51.6	34	43.9
21	39	61.1	32.6	57.4
7	45	68.5	45.7	72.4
31	45	56.1	32.7	38.2
17	46	56.9	30.9	54.4
23	57	47.4	28.9	120
4	60	45.8	32.9	74.6
30	66	37	22.8	42.9
3	67	49.2	39.2	90.7
26	72	37.8	21	39.8
1	76	51	32.3	43.6
9	78	48.2	37.4	45.5
29	83	33.6	22.4	50.3
28	93	47.5	28.1	42.3
Pacientes con TIP No Activa (Igual o mas de 100×10^9 plaquetas/L)				
10	108	56.4	42	4.98
13	119	37.7	25.4	37.4
8	123	71.3	46.9	73.3
18	126	51	26.4	53
2	134	39.5	22.7	36.2
11	185	50	26.7	31.3
12	203	35.6	18.9	24.5
20	227	58.1	37.4	48.1
6	268	78.6	67.9	121
25	338	47.7	20.4	27.9

* En región de Linfocitos B(CD 19+). **En región de Monocitos.

En la tabla 5, se enlistan la distribución por grupos de los 31 pacientes con TIP. Previamente comentados en la sección de análisis. Las correlaciones apreciadas no fueron significativas.

Tabla 5. Distribución por grupos y coeficientes de correlación apreciados, mediante calculo de r de Spearman, Prueba de Mann Whitney, en las distribuciones con mas de 2 grupos se calculo prueba de Kruskal- Wallis.

Descripción de los grupos	Grupos y numero de folios de pacientes en cada uno de ellos	Análisis estadístico
Distribucion en Grupos de respuesta a partir de conteo plaquetario. ¹	TIP SIN RESPUESTA: 15, 27, 24,31,22, 14,5	Prueba de Kruskal- Wallis a partir de porcentaje de expresión de CD 32b p= 0.7118 Estadística de Kruskal-Wallis= 0.6798 Prueba de Kruskal- Wallis a partir de la IMF de CD 32b p= 0.6593 Estadística de Kruskal- Wallis= 0.8332
	TIP EN RESPUESTA PARCIAL: 19, 16, 7, 3, 17, 23, 4, 21, 26, 1, 9, 29,30,28	
	TIP EN RESPUESTA COMPLETA: 10, 13, 8, 18, 2, 11, 6, 12, 20, 25	
Distribución en Grupos de Pacientes con esteroides y sin esteroides al momento de la toma de muestra. ²	TIP SIN ESTEROIDE: 1, 2, 3, 7, 9, 10,11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 25	Para porcentaje de expresión CD32b r Spearman=- 0.154 p= 0.599 U de Mann-Whitney= 117.0 p= 0.9525 Para IMF de CD 32b r Spearman= 0.4813 p= 0.0814 U de Mann-Whitney= 115.5 p= 0.9052
	TIP CON ESTEROIDE: 4, 5, 6, 8, 14, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31	
Distribución en Grupos a partir de actividad de TIP definidas a partir del conteo plaquetario. ³	TIP ACTIVA: 15, 27, 24, 14, 16, 5, 22, 19, 21, 7, 31, 17, 23, 4, 30, 3, 26, 1, 9, 29, 28	Para porcentaje de expresión CD32b r Spearman=- 0.4303 p= 0.2182 U de Mann-Whitney= 90.50 p= 0.5541 Para IMF de CD 32b r Spearman= - 0.6727 p= 0.0390 U de Mann-Whitney= 99.50 p= 0.8326
	TIP NO ACTIVA: 10, 13, 8, 18, 2, 11, 12, 20, 6, 25	
Distribucion en grupos a partir de la evolución clínica al momento del estudio. ⁴	TIP NOVO: 6, 14, 17, 21, 22, 24, 26, 27, 31	Prueba de Kruskal- Wallis a partir de porcentaje de expresión de CD 32b p= 0.5563 Estadística de Kruskal-Wallis= 3.009 Prueba de Kruskal- Wallis a partir
	TIP RECAIDA:15, 20, 23, 28, 29, 30	

	TIP CRONICA ACTIVA: 1, 4, 7, 9, 16, 19	de la IMF de CD 32b p= 0.3003 Estadística de Kruskal- Wallis= 4.876
	TIP CRONICA NO ACTIVA: 2, 8, 10, 11, 12, 13, 18, 25	
	TIP REFRACTARIA: 3, 5	
Distribución en Grupos a partir de presencia o no de esplenectomía	TIP ESPLENECTOMIZADOS: 3, 5, 11, 18, 25	Para porcentaje de expresión CD32b r Spearman=- 0.300 p= 0.6833 U de Mann-Whitney= 63.50 p= 0.9572 Para IMF de CD 32b r Spearman= - 0.600 p=0.3500 U de Mann-Whitney= 45.00 p= 0.2949
	TIP NO ESPLENECTOMIZADOS: 1,2,4,6,7,8,9,10,12,13,14,15,16, 17,19,20,21,22,23,24,26,27,28, 29,30,31	
<p>¹ Grupos de respuesta a partir de los criterios del International Working Group: Sin respuesta menor a 30×10^9 plaquetas/L , En respuesta parcial de 30 a 100×10^9 plaquetas/10^9 plaquetas/L y en respuesta completa mayor de 100×10^9 plaquetas/L.</p> <p>² Los pacientes sin esteroide tienen más de 1 mes sin administración.</p> <p>³ TIP activo se define aquellos con conteo plaquetario inferior a $100 \times 10^9/L$. TIP No activa aquellos con conteo plaquetario mayor o igual a $100 \times 10^9/L$</p> <p>⁴ Ver Texto, Analisis en Material y Métodos</p>		

Se recolectaron 21 controles sanos obtenidos de los Buffy Coats de Controles Sanos del Banco Central de Sangre CMN S XXI, con cifra plaquetaria por arriba de $150 \times 10^9/L$ en base a los estatutos que rigen la selección de Donadores en la Norma Oficial Mexicana.

En la siguiente tabla, se exponen los valores obtenidos de porcentaje de expresión e IMF de CD32b en los controles Sanos.(Tabla6)

Tabla 6. Porcentaje de expresión e IMF de CD 32b en controles			
numero control	% CD 32b*	IMF CD32b*	IMF CD 32b**
C001	43.5	17.2	25.6
C002	18.5	8.79	27
C003	12.5	6.16	20.4
C004	14.1	7.02	19.9
C005	11.3	6.99	25.2
C006	14.6	8.94	17.2
C007	20.8	11	22.3
C008	18.6	9.5	31
C009	14.7	7.1	11.6
C010	19.1	8.8	16.3
C011	21.4	7.12	10.8
C012	9.92	6.1	16.2
C013	13.1	6.96	16.4
C014	18	8.4	11.6
C015	21.4	9.45	17.1
C016	24.3	13.3	22.1
C017	23.4	12.1	19.5
C018	20.4	8.62	12.8
C019	25.1	11	22.7
C020	37.1	16.3	33
C021	14	6.01	11.2
* En región de Linfocitos **En región de Monocitos			

EL PORCENTAJE DE EXPRESIÓN PORCENTUAL DE CD 32b EN LA REGION DE LINFOCITOS B.

Se apreció un incremento significativo en la expresión porcentual de CD 32b en la región de Linfocitos B (CD 19+) en los pacientes con TIP en relación a los controles. La distribución de los Valores fue Asimétrica tanto en los controles sanos como en los pacientes con TIP (Tabla 7 y 8). El valor porcentual promedio en los pacientes con TIP y controles fueron de 50.10% y 19.80% células CD 32b positivas en la región de Linfocitos B (CD 19 +), respectivamente.

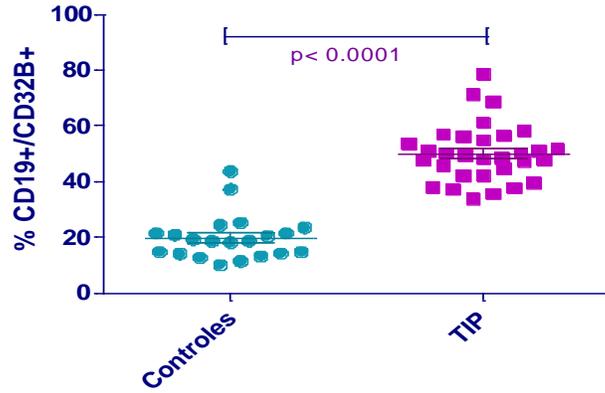
Tabla 7. Porcentaje de Expresión de CD32b en región de Linfocitos B(CD 19+) en pacientes con TIP		
N		31
Promedio		50.1032
Desviación Estándar		10.36480
Sesgo		.818
Error Estándar de Sesgo		.421
Kurtosis		.969
Error Estándar de Kurtosis		.821
Percentiles	25	42.2000
	50	49.2000
	75	56.1000

Tabla 8. Porcentaje de Expresión de CD32b en región de Linfocitos B(CD 19b+) en Controles Sanos		
N		21
Promedio		19.8010
Desviación Estándar		8.13279
Sesgo		1.628
Error Estándar de Sesgo		.501
Kurtosis		3.124
Error Estándar de Kurtosis		.972
Percentiles	2.5	9.9200
	25	14.0500
	50	18.6000
	75	22.4000
	97.5	43.5000

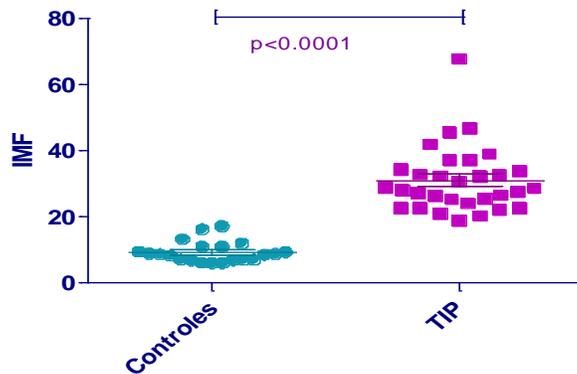
Se realizó prueba de Mann-Whitney para ambos grupos a partir del porcentaje de expresión de CD 32b en la región de Linfocitos B(CD 19+), apreciándose significancia estadística con un p menor a 0.0001. (Tabla 9, Gráfica 2)

TABLA 9. Prueba de Mann-Whitney aplicada entre pacientes con TIP y controles sanos a partir del porcentaje de expresión de CD 32b			
GRUPO	N	Rango Promedio	Suma de Rangos
PTI	31	36.65	1136.00
SANO	21	11.52	242.00
Mann-Whitney U			11.000
Wilcoxon W			242.000
Z			-5.865
p			< 0.0001

Grafica 2. Prueba de Mann-Whitney. Distribución de pacientes a partir de porcentaje de expresión de CD 32b en región de Linfocitos B.



Grafica 3. Prueba de Mann-Whitney. Distribución de pacientes a partir de la IMF de CD 32b en región de Linfocitos B (CD19+).



LA INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA (IMF) DE CD 32b EN LA REGION DE LINFOCITOS B.

Se apreció un incremento significativo de la IMF de células CD 32b en la región de Linfocitos B (CD 19+). La distribución de los Valores fue Asimétrica tanto en los controles como en los pacientes con TIP y los controles (Tabla 10 y 11). El valor de IMF promedio en los pacientes con TIP y controles fueron de 31.17 IMF y 9.37 IMF en la región de Linfocitos B (CD 19 +), respectivamente.

Tabla 10. IMF de Células CD32b en región de Linfocitos B de pacientes con TIP		
N		31
Promedio		31.1742
Desviación Estándar		9.92784
Sesgo		1.863
Error Estándar de Sesgo		.421
Kurtosis		5.141
Error Estándar de Kurtosis		.821
Percentiles	25	24.1000
	50	28.7000
	75	34.5000

Tabla 11. IMF de Células CD32b en región de Linfocitos B de controles sanos		
N		21
Promedio		9.3743
Desviación Estándar		3.15765
Sesgo		1.279
Error Estándar de Sesgo		.501
Kurtosis		1.151
Error Estándar de Kurtosis		.972
Percentiles	2.5	6.0100

	25	7.0050
	50	8.7900
	75	11.0000
	97.5	17.2000

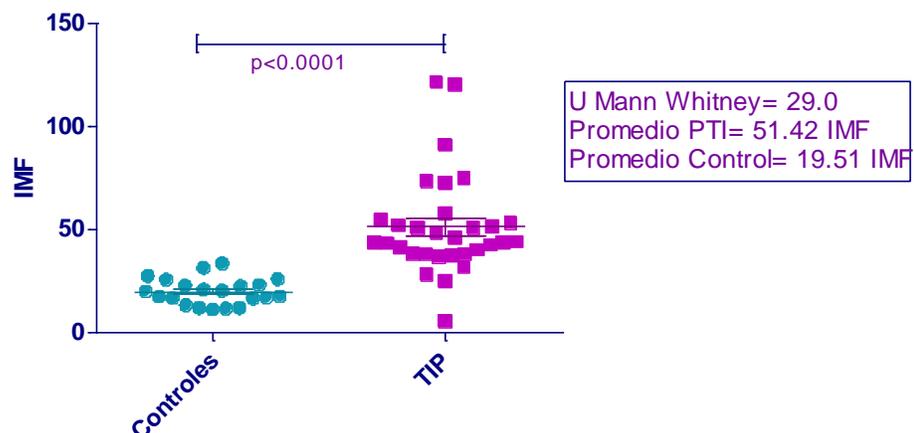
Se realizó prueba de Mann-Whitney para ambos grupos a partir de la IMF de CD32b en la región de Linfocitos B (CD 19+), apreciándose significancia estadística con una p menor a 0.0001. (Tabla 12, Grafica 3)

TABLA 12. Prueba de Mann-Whitney aplicada entre pacientes con TIP y controles sanos a partir de la IMF de CD 32b en la región de Linfocitos B (CD 19+)

GRUPO	N	Rango Promedio	Suma de Rangos
PTI	31	37.00	1147.00
SANO	21	11.00	231.00
Mann-Whitney U			.000
Wilcoxon W			231.000
Z			-6.071
p			< 0.0001

Así también se apreció un incremento en la IMF de CD 32b de linfocitos B (CD 19+) en la Región de Monocitos, con Prueba de Mann-Whitney significativa al tener una $p < 0.0001$. (Grafica 4)

Grafica 4. Prueba de Mann-Whitney. Distribución de pacientes a partir de la IMF de CD 32b de Linfocitos B (CD19+) en región de Monocitos.



DISCUSIÓN

CD 32b es una molécula que se ha descrito incrementada en los linfocitos B naive de los pacientes con LES en relación a las Células B de Memoria. En el presente estudio, mediante Citometria de Flujo encontramos en la TIP un incremento en la expresión porcentual y por IMF significativo de esta molécula en la región de Linfocitos B (CD 19+) en relación a los controles sanos.

La cifra probable normal de CD 32b , calculada a partir de la distribución percentil 2.5- 97.5 de el porcentaje de expresión e IMF de CD 32b en la región de Linfocitos B de los pacientes control, son de 9.92% a 43.50% así como 6.01IMF a 17.20IMF, respectivamente. Sin embargo el número de pacientes controles para definir normalidad no es suficiente para definir ello, por lo que es necesario realizar un estudio con un número de controles mayor.

A pesar de que en nuestro estudio no se separaron a las poblaciones de Linfocitos B pudimos identificar que la TIP se encuentra asociada a sobreexpresión de CD 32b en linfocitos B. Este incremento no presentó una correlación significativa a partir de pruebas no paramétricas del conteo plaquetario, la evolución clínica presentada y el uso actual o no de esteroides.

En el 2001 se publicó por parte de la Dra Ott y colaboradores de la universidad de Colorado que la IgG Administrada en pacientes con patologías autoinmunes tiene su potencial blanco molecular sobre la expresión y modulación del Cd 32b y sus vías de regulación hacia SHIP.⁶⁸ Sin embargo a partir de nuestras observaciones podemos inferir que CD 32b se encuentra sobreexpresado en los linfocitos B de los pacientes con TIP, y muy probablemente nos traduce que los pacientes con

esta patología podrían tener una disfunción molecular a este nivel o a nivel de sus vías de señalización intracelular.

Respecto a lo último comentado, Recientemente un grupo Alemán dirigido por el Dr Neumann describen, en modelos murinos, a la molécula Cd32B como correceptor para el Receptor de Célula B(BCR), previniendo la activación de la Célula B madura después de coligarse a BCR. Así también describen que estas dos moléculas forman un complejo Ternario con la molécula Grb-2 y esto condiciona la activación de la Kinasa 3(dok-3), SHP-2 y el dominio SH2 que contiene la Fosfatasa de Inositol(SHIP). Describen que la actividad inhibitoria de cd 32b requiere la presencia de grb-2.⁶⁹

Los estudios realizados en el 2005 por el Grupo de trabajo, en la universidad de Rockefeller, del Dr Mc Gaha ⁵⁵ demostraron que en ratones para estudio de enfermedades autoinmunes, el inducir expresión expresión de CD32b mediante el empleo de técnicas virales, por arriba del 40% del basal incrementaba la autotolerancia de ellos y mediante ello dejaron de expresar autoinmunidad.

En la siguiente Tabla 13 mencionamos los estudios clínicos en donde se aprecia la expresión de CD32b, tanto en Lupus Eritematoso Sistémico como en Artritis Reumatoide.

Tabla 13. Estudios clinicos en los que se describe la expresión de CD 32b en pacientes con Enfermedades autoinmunes.

Autor	Patologia	Población de estudio	Anticuerpo CD 32b utilizado	Descripción	Resultados
Mackay M, et al (2006) ⁷⁰	Lupus Eritematoso Sistémico	Controles A: 18 (Caucasicos y asiáticos) Controles B: 38 (Afroamericanos e Hispanos) Pacientes LES: 62	Monoclonal de Ratón 2b6, IgG ₁	Se analizó la expresión de CD 32b en Células Naive , Células de Memoria y plasmablastos en los diversos grupos. Se define el Delta IMF como la diferencia entre IMF de células Naive B y el IMF de Células B de Memoria dividido entre la expresión IMF de las células Naive B y multiplicado por 100. Un delta IMF menor a -15 es regulación a la baja de CD32b y un delta IMF superior a 15 es regulación a la alta de CD32b	<p>- Baja expresión de CD 32b en las células B Memoria en pacientes con LES relación a los controles (p<0.001)</p> <p>- En los pacientes normales se aprecia incremento en la expresión de cd 32b en las células B maduras en relación a las células Naive B (P<0.001)</p> <p>-Baja expresión de CD 32b en plasmablastos de pacientes con LES en relación a las células Naive B(P<0.001)</p> <p>- Cuartiles 25 y 75 en controles: Células Naive B 25 IMF- 60 IMF Células B Madura 35IMF- 70 IMF Plasmablastos 30IMF-60 IMF</p> <p>Cuartiles 25 y 75 en Pacientes con LES Células Naive B 25 IMF- 55IMF Células B Madura 25IMF- 55 IMF Plasmablastos 20IMF-40 IMF</p> <p>-No se apreciaron diferencias significativas en términos de duración de la enfermedad, Actividad de la enfermedad en base a SLEDAI, Uso de agentes inmunosupresores, títulos de anticuerpos anti DNAs, niveles de complemento o presencia de enfermedad renal en relación a la expresión de CD 32b.</p> <p>-Regulación a la baja de IMF CD32b en pacientes de raza afroamericana.</p>
Su K, et al (2007) ⁶⁵	Lupus Eritematoso Sistémico	Controles 30 LES Activo (SLEDAI >= 2) 19 LES Inactivo (SLEDAI = 0) 5	Anticuerpo monoclonal de ratón 4F5, IgG ₁	Se cuantifico la expresión de CD 32b los linfocitos B naive, de Memoria y Plasmáticas; en los diversos grupos de estudio.	<p>- En pacientes con actividad en LES presentan incremento en el porcentaje de células B plasmáticas(26.3 % vs 15.0%).</p> <p>- La expresión de CD 32b se encuentra disminuida en los linfocitos B de memoria y las células plasmáticas de los pacientes con LES Activo en relación a los controles sanos(p < 0.001 y p <0.03).</p> <p>-En el grupo de LES activo se apreció mediante prueba de t student diferencia estadística significativa entre el porcentaje de expresión en los linfocitos B de memoria – plasmáticas y los linfocitos B Naive (p<0.05 y p<0.04)</p> <p>- No se definieron cuartiles o percentiles.</p>

Prokopek K, et al (2010) ⁶³	Artritis Reumatoide	Controles 38 AR Activa 14 AR No activa 18	Anticuerpo monoclonal de ratón GB3 combinado con Biotina. IgG ₁	Se cuantifico la expresión de CD 32b en Linfocitos B (CD19+) en los diferentes grupos de estudio.	<ul style="list-style-type: none"> - El porcentaje promedio de expresión de CD 32b fue menor en pacientes con AR en relación a los controles sanos (76.9% vs 96.4%) $p < 0.05$ - La intensidad media de fluorescencia de CD 32b sobre células CD 19 + fue inferior en los pacientes con AR(60 IMF vs 120 IMF) $p < 0.001$ - No hubieron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de pacientes con AR activa y no activa. - La intensidad media de Fluorescencia promedio de cd 32b en los controles sanos fueron inferiores en el sexo femenino (prueba t student , $p < 0.05$) -Existe una reducción en la IMF de CD 32b en los controles sanos del sexo Femenino a mayor edad, estadísticamente significativa (prueba de Pearson, $r = 0.27$, $p = 0.03$)
--	---------------------	---	--	---	--

Analizando estos datos y las observaciones realizadas por los anteriores autores los fenómenos reumatológicos se asocian a expresión a la baja de CD 32b en los linfocitos B, siendo definido en los pacientes con LES regulación a la baja en linfocitos B de Memoria y plasmáticas y en los pacientes con AR regulación a la baja de este marcador en la población global de Linfocitos B.

Con todo esto podemos definir a la TIP como un síndrome autoinmune asociado a sobreexpresión de CD32b en relación a los controles sanos. Sin embargo se requieren estudios con mayor número de pacientes, así también se requiere el estudio de esta molécula en otro tipo de fenómenos autoinmunes tal como SAAF.

Sobre estas observaciones podemos deducir dos panoramas clinico- biológicos: el primero de ellos de autoinmunidad, en el que existe un probable incremento en la expresión de CD 32b en linfocitos B; y el segundo de Procesos Reumatológicos, tal como el LES y la AR, donde existe un decremento bien documentado en la expresión de CD 32b.(figura 1)

FIGURA 1. Diferencias en la expresión de CD 32b en Linfocitos B en Patologías con fondo Autoinmune y enfermedad Reumatológica	
PATOLOGIA CON FONDO AUTOINMUNE	ENFERMEDAD REUMATOLOGICA
TIP	LES
	AR
	SINDROME DE GOODPASTURE(??)* ⁶⁴
EXPRESION A LA ALTA DE CD 32b EN LINFOCITOS B	EXPRESIÓN A LA BAJA CD 32b EN LINFOCITOS B
	
* Apreciación hecha en modelo murino, no hay estudios clinicos documentados al respecto	

Esto último comentado nos lleva a pensar si estas patologías autoinmunes son el preambulo para la aparición de patologías reumatológicas definidas, sin embargo la progresión a LES en particular en pacientes con TIP no ha sido definida. Así también aproximadamente un 15 a 20% de los pacientes con Lupus presentan trombocitopenia. Park y colaboradores definieron diferencias en la etiopatogenia de la trombocitopenia en LES y en TIP, a partir de observaciones en los linfocitos T reguladores CD 4+,CD 25+ (TREG), en donde mediante analisis estadístico no paramétricos apreciaron bajos niveles de TREG en pacientes con Lupus en relación a los pacientes con TIP.

A pesar de lo anterior comentado, se necesitan mas estudios para concretar si la sobreexpresión de CD 32b en linfocitos B pueda ser considerada una característica asociada patologías con fondo Autoinmune, tal como las anemias hemolíticas autoinmunes y el SAAF principalmente. Así también se requiere esta

misma observación en entidades clínicas que caen dentro del terreno reumatológico como lo son el SX de Sjogren, Enfermedad Mixta del tejido conectivo, Esclerosis Sistémica Progresiva, entre otras.

La expresión a la alta de CD 32b en linfocitos B de los pacientes con TIP a partir de los resultados no se encuentra influenciada por el tratamiento o las características clínicas de los pacientes, esto en base a las diferencias no significativas apreciadas mediante análisis correlacional. Esto nos lleva a dos probables fenómenos que pudiesen estar ocurriendo en el paciente con TIP: el primero de ellos es que la expresión a la alta de CD 32b sea condicionada por las citocinas circulantes; se conocen hasta el momento tres citocinas que pueden inducir regulación a la alta de CD 32b estas son la interleucinas 4, 13 y 10.^{72,73,74} Un segundo fenómeno que pudiese estar asociado a la sobreexpresión de esta molécula es que exista disfunción molecular a nivel de CD 32b, ya sea en su acoplamiento a BCR o en incapacidad para formar el complejo Ternario, y por ende incapacidad para inducir la Inhibición celular mediada por SHIP, principalmente. Para definir todo esto se requieren una serie de estudios moleculares que faltan aun por desarrollar.

CONCLUSIONES

CD 32b es una molécula que presenta una expresión a la alta en Linfocitos B de pacientes con TIP, a diferencia de lo observado en LES y AR. Esta sobreexpresión de CD 32b no se encuentra relacionada al uso de fármacos o las características clínicas presentadas en los pacientes TIP.

No podemos generalizar esta observación a otras patologías con fondo autoinmune, ya que no existen estudios al respecto.

Al igual que en los estudios clínicos donde se observó la expresión de CD32b en Linfocitos B de pacientes con LES y AR, no se pueden definir los valores de expresión normales en la población, debido a el número bajo de controles analizados. Sin embargo a partir de los percentiles 2.5 y 97.5 de la distribución presentada en los controles sanos tenemos un probable rango de normalidad; para el porcentaje de expresión de CD 32b en linfocitos B de 9.92% a 43.50%, y la IMF de CD32b en Linfocitos B de 6.01IMF a 17.2 IMF.

Se realizó estadística no paramétrica debido a la distribución irregular de los valores obtenidos de CD32b en linfocitos B definida en los pacientes TIP y controles sanos. Sin embargo desconocemos si incrementando el número de pacientes TIP y controles esta distribución sea diferente.

Así también al apreciarse expresión a la alta de CD 32b los pacientes con TIP, podemos decir que esta molécula puede ser candidata a ser evaluado como probable marcador diagnóstico en esta patología.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cuker A, Cines D. Immune Trombocytopenia. Education Program Book. Hematology 2010. 377-384
2. Lichtman M, Beutler E, Kipps T, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal J. Thrombocytopenia. Williams Hematology 7a ed. Cap 110: p1749-1783.
3. Coopamath MD, Garvey MB, Freedman J, Semple JW. Cellular immune Mechanisms in Autoimmune Thrombocytopenic Purpura: An update. *Transfus Rev Med* 2003. 17: 69-80.
4. Yu J, Heck S, Patel V, et al. Defective Circulating CD 25 regulatory T cells in patients with Chronic Immune Thrombocytopenic Purpura. *Blood* 2008. 112: 1325- 1328.
5. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol* 1999. 17:593.
6. Daron M. Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol* 1997. 15:203.
7. Van Den Herik-Oudijk IE, Capel PJ, Van der Bruggen T, van de Winkel JG. Interaction of a human Fc_RIIb1 (CD32) isoform with murine and human IgG subclasses *Blood* 1995. 85:2202.
8. Ernst LK, Duchemin AM, Anderson CL. Association of the high-affinity receptor for IgG (Fc_RI) with the γ subunit of the IgE receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993.90:6023.
9. Tridandapani SK. Siefker JL, Teillaud J, Carter O, Wewers MD, Anderson CL.. Regulated expression and inhibitory function of Fc_RIIb in human monocytic cells. *J. Biol. Chem* 2002. 277:5082.
10. Pricop L, Redecha P, Teillaud JL, Frey J, Fridman WH, Fridman CS, Salmon JE. Differential modulation of stimulatory and inhibitory Fc_ receptors on human monocytes by Th1 and Th2 cytokines. *J. Immunol* 2001. 166:531.
11. Clynes R, Maizes JS, Guinamard R, Ono M, Takai T, Ravetch JV. Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *J. Exp. Med* 1999. 189: 179.
12. Hunter S, Indik ZK, Kim MK, Cauley MD, Park JG, Schreiber AD. Inhibition of Fc_ receptor-mediated phagocytosis by a nonphagocytic Fc_ receptor. *Blood* 1998. 91:1762.

13. Tridandapani S, Kelley T, Pradhan M, Cooney D, Justement LB, Coggeshall KM. Recruitment and phosphorylation of SH2-containing inositol phosphatase and Shc to the B-cell Fc_γ immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif peptide motif. *Mol. Cell. Biol* 1997. 17:4305.
14. Tridandapani S, Pradhan M, LaDine JR, Anderson CL, Coggeshall KM. Protein interactions of Src homology 2 (SH2) domain-containing inositol phosphatase (SHIP): association with Shc displaces SHIP from Fc_γRIIb in B cells. *J. Immunol* 1998. 162:1408.
15. McKenzie SE, Taylor SM, Palladi P. The role of the human Fc Receptor FcRIIA in the immune clearance of platelets: a transgenic mouse model. *J Immunol* 1999.162: 4311-4318.
16. Mylvaganam R, Ahn YS, Harrington WJ, Kim CI, Gratzner HG. Differences in T cell subsets between men and women with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1985; 66: 967–972.
17. Olsson B, Andersson PO, Jerna^os M et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat Med* 2003; 9: 1123–1124.
18. Semple JW, Milev Y, Cosgrave D et al. Differences in serum cytokine levels in acute chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: relationship to platelet phenotype and antiplatelet T-cell reactivity. *Blood* 1996; 87: 4245–4254.
19. Zhang F, Chu X, Wang L et al. Cell-mediated lysis of autologous platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 2006; 76: 427–431.
20. Zhang X, Chen S, Yang L, Li B, Zhu K, Li Y. The feature of TRGV and TRDV repertoire distribution and clonality in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Hematology* 2009; 14: 237-244.
21. Forster A, Huck S, Ghanem N, Lefranc MP, Rabbitts TH. New subgroups in the human T cell rearranging V gamma gene locus. *EMBO J* 1987; 6: 1945–1950.
22. Lefranc MP, Rabbitts TH. The human T-cell receptor gamma (TRG) genes. *Trends Biochem Sci* 1989; 14: 214–218.
23. Takihara Y, Tkachuk D, Michalopoulos E et al. Sequence and organization of the diversity, joining, and constant region genes of the human T-cell delta-chain locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6097–6101.

24. Raulet DH, Garman RD, Saito H, Tonegawa S. Developmental regulation of T-cell receptor gene expression. *Nature* 1985; 314: 103–107.
25. Rabbitts TH, Lefranc MP, Stinson MA et al. The chromosomal location of T-cell receptor genes and a T cell rearranging gene: possible correlation with specific translocations in human T cell leukaemia. *EMBO J* 1985; 4: 1461–1465.
26. Murre C, Waldmann RA, Morton CC et al. Human gamma-chain genes are rearranged in leukaemic T cells and map to the short arm of chromosome 7. *Nature* 1985; 316: 549–552.
27. Lefranc MP, Forster A, Rabbitts TH. Genetic polymorphism and exon changes of the constant regions of the human T-cell rearranging gene gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 9596–9600
28. Matsumoto Y, Yoon WK, Jee Y, Fujihara K, Misu T, Sato S, Nakashima I, Itoyama Y. Complementarity-determining region 3 spectratyping analysis of the TCR repertoire in multiple sclerosis. *J Immunol* 2003; 170: 4846–4853.
29. Sun W, Nie H, Li N et al. Skewed T-cell receptor BV14 and BV16 expression and shared CDR3 sequence and common sequence motifs in synovial T cells of rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2005; 6: 248–261.
30. Kato T, Kurokawa M, Sasakawa H et al. Analysis of accumulated T cell clonotypes in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2712–2721.
31. Hedlund-Treutiger I, Wahlstrom J, Elinder G. Role of the T cell receptor in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Acta Paediatr* 1998; Suppl 424: 46–50.
32. Hedlund-Treutiger I, Elinder G, Wigzell H, Grunewald J, Wahlström J. T cell receptor V gene usage by CD4z and CD8z peripheral blood T lymphocytes in immune thrombocytopenic purpura. *Acta Paediatr* 2004; 93: 633–637.
33. Zhang XL, Li YQ, Chen SH et al. The feature of clonal expansion of TCR Vb repertoire, thymic recent output function and TCR f chain expression in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Int J Lab Hematol* Published Online: Aug 7 2008
34. Stasi R, Del Poeta G, Stipa E et al. Response to B-cell depleting therapy with rituximab reverts the abnormalities of T-cell subsets in

- patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2007; 110: 2924–2930.
35. Wu S, Li Y, Jian Z, Tang F. Anti-Helicobacter pylori treatment in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2009;34(12):1251-4.
 36. Cortelazzo S, Finazzi G, Buelli M, et al. High Risk of severe Bleeding in aged patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1991. 77:31
 37. McIntyre OR, Ebaugh FGJ. Palpable Spleens in college Freshmen. *Ann Intern Med* 1967. 66: 301
 38. Amigorena S, Bonnerot C, Drake JR, Choquet D, Hunziker W, Guillet JG, Webster P, Sautes C, Mellman I, Fridman WH. Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science* 1992. 256: 1808–1812.
 39. Ono M, Bolland S, Tempst P, Ravetch JV. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc RIIB. *Nature* 1996. 383: 263–266.
 40. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol* 2001. 19: 275–290.
 41. Hunter S, Indik ZK, Kim MK, Cauley MD, Park JG, Schreiber AD. Inhibition of Fc receptor-mediated phagocytosis by a nonphagocytic Fc receptor. *Blood* 1998. 91: 1762–1768.
 42. Pricop L, Redecha P, Teillaud JL, Frey J, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Salmon JE. Differential modulation of stimulatory and inhibitory Fc receptors on human monocytes by Th1 and Th2 cytokines. *J. Immunol* 2001. 166: 531–537.
 43. Katz HR. Inhibitory receptors and allergy. *Curr. Opin. Immunol* 2002. 14:698–704.
 44. Ott VL, Tamir I, Niki M, Pandolfi PP, Cambier JC. Downstream of kinase, p62^{dok}, is a mediator of Fc γ IIB inhibition of Fc ϵ RI signaling. *J. Immunol* 2002. 168: 4430–4439.
 45. Boruchov AM, Heller G, Veri MC, Bonvini E, Ravetch JV, Young JW. Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J. Clin. Invest* 2005. 115: 2914–2923.
 46. Dhodapkar KM, Kaufman JL, Ehlers M, Banerjee DK, Bonvini E, Koenig S, Steinman RM, Ravetch JV, Dhodapkar MV. Selective

- blockade of inhibitory Fc_γ receptor enables human dendritic cell maturation with IL-12p70 production and immunity to antibody-coated tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005. 102: 2910–2915.
47. Samsom JN, van Berkel LA, van Helvoort JM, Unger WW, Jansen W, Thepen T, Mebius RE, Verbeek SS, Kraal G. Fc_γRIIB regulates nasal and oral tolerance: a role for dendritic cells. *J. Immunol* 2005. 174: 5279–5287.
 48. Bergtold A, Desai DD, Gavhane A, Clynes R. Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity* 2005. 23: 503–514.
 49. Qin D, Wu J, Vora KA, Ravetch JV, Szakal AK, Manser T, Tew JG. Fc_γ receptor IIB on follicular dendritic cells regulates the B cell recall response. *J. Immunol* 2005. 164: 6268–6275.
 50. Takai T, Ono M, Hikida M, Ohmori H, Ravetch JV. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc_γRII-deficient mice. *Nature* 1996. 379: 346–349.
 51. Bolland S, Ravetch JV. Spontaneous autoimmune disease in Fc_γRIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity* 2000. 13: 277–285.
 52. Pritchard NR, Cutler AJ, Uribe S, Chadban SJ, Morley BJ, Smith KG. Autoimmune-prone mice share a promoter haplotype associated with reduced expression and function of the Fc_γ receptor Fc_γRII. *Curr. Biol* 2000. 10: 227–230.
 53. Jiang Y, Hirose S, Abe M, Sanokawa-Akakura R, Ohtsuji M, Mi X, Li N, Xiu Y, Zhang D, Shirai J, et al. Polymorphisms in IgG Fc_γ receptor IIB regulatory regions associated with autoimmune susceptibility. *Immunogenetics* 2000. 51: 429–435.
 54. Xiu Y, Nakamura K, Abe M, Li N, Wen XS, Jiang Y, Zhang D, Tsurui H, Matsuoka S, Hamano Y, et al. Transcriptional regulation of *Fcgr2b* gene by polymorphic promoter region and its contribution to humoral immune responses. *J. Immunol* 2002. 169: 4340–4346.
 55. McGaha TL, Sorrentino B, Ravetch JV. Restoration of tolerance in lupus by targeted inhibitory receptor expression. *Science* 2005. 307: 590–593.

56. Wakeland EK, Liu K, Graham RR, Behrens TW. Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity* 2001. 15: 397–408.
57. Su K, Li X, Edberg JC, Wu J, Ferguson P, Kimberly RP. A promoter haplotype of the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing Fc_γRIIb alters receptor expression and associates with autoimmunity. II. Differential binding of GATA4 and Yin-Yang1 transcription factors and correlated receptor expression and function. *J. Immunol* 2004. 172: 7192–7199.
58. Su K, Wu J, Edberg JC, Li X, Ferguson P, Cooper GS, Langefeld CD, Kimberly RP. A promoter haplotype of the immunoreceptor tyrosinebased inhibitory motif-bearing Fc_γRIIb alters receptor expression and associates with autoimmunity. I. Regulatory FCGR2B polymorphisms and their association with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol* 2004. 172: 7186–7191.
59. Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, Fukazawa T, Jansen MD, Hashimoto H, van de Winkel JG, et al. Fc_γ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: contribution of FCGR2B to genetic susceptibility. *Arthritis Rheum* 2002. 46: 1242–1254.
60. Li X, Wu J, Carter RH, Edberg JC, Su K, Cooper GS, Kimberly RP. A novel polymorphism in the Fc_γ receptor IIB (CD32B) transmembrane region alters receptor signaling. *Arthritis Rheum* 2003. 48: 3242–3252.
61. Blank MC, Stefanescu RN, Masuda E, Marti F, King PD, Redecha PB, Wurzburger RJ, Peterson MG, Tanaka S, Pricop L. Decreased transcription of the human *FCGR2B* gene mediated by the ₋₃₄₃ G/C promoter polymorphism and association with systemic lupus erythematosus. *Hum. Genet* 2005. 117: 220–227.
62. Chu ZT, Tsuchiya N, Kyogoku C, Ohashi J, Qian YP, Xu SB, Mao CZ, Chu JY, Tokunaga K. 2004. Association of Fc_γ receptor IIb polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese: a common susceptibility gene in the Asian populations. *Tissue Antigens* 2004. 63: 21–27.
63. Prokopec K, Rhodiner M, Matt P, Lindqvist U, Kleinau S. Down regulation of Fc and complement receptors on B cells in rheumatoid arthritis. *Clinical Immunology* 2010. 137, 322–329

64. Nakamura A, Yuasa T, Ujike A, Ono M, Nukiwa T, Ravetch J, et al. Fcγ Receptor IIB-deficient Mice Develop Goodpasture's Syndrome upon Immunization with Type IV Collagen: A Novel Murine Model for Autoimmune Glomerular Basement Membrane Disease. *J Experimental Med* 2000. 191: 899-905.
65. Su K, Yang H, Li X, Li X, Gibson AW, Cafardi JM, et al. Expression Profile of Fc gamma RIIb on Leukocytes and its dysregulation in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 2007. 178: 3272-3280.
66. Rhodéguiéro F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, 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;113:2386-2393
67. Therrell D, Beebe L, Vesely S, Neas B, Segal J, George J. The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: A critical review of published reports. *Am J Hematol* 2010. 85:174– 180.
68. Ott V, Fong D, Cambier J. FcγRIIB as a potential molecular target for intravenous gamma globulin therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001. 108: S95-S98
69. Neumann K, Oellerich T, Heine I, Urlaub H, Engelke M. Fc gamma receptor IIb modulates the molecular Grb2 interaction network in activated B cells. *Cell Signal*. 2011 Jan 22.
70. Mackay M, Stanevsky A, Wang T, Aranow C, Li M, Koenig S, et al. Selective dysregulation of the Fc gamma IIB receptor on memory B cells in SLE. *J Exp Med* 2006. 203: 2157-64.
71. Park SH, Kim JY, Kim SK, Choe JY, Kim SG, Ryoo HM. Regulatory T Cells in Systemic Lupus Erythematosus-associated Thrombocytopenia: a comparison with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Lupus* 2010. 19: 888-889
72. Booth JW. Phosphoinositides in Fc gamma receptor signaling. *Front Biosci* 2006; 11: 1264- 1274.
73. Joshi T, Butchar JP, Tridandapani S. Fc gamma Receptor signaling in Phagocytes. *Int J Hematol* 2006; 84: 210- 216.
74. Swanson JA, Hoppe AD. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 1093- 2003.