

03062

7

2el.

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE  
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

RELEVANCIA DE PEPTIDOS ANTIGÉNICOS DE LA  
GLUCOPROTEINA IIIa EN LA PURPURA  
TROMBOCITOPÉNICA AUTOINMUNE

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA  
(INMUNOLOGÍA)

P R E S E N T A  
Q.F.B. MA. VICTORIA DOMÍNGUEZ GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS DR. CARLOS LARRALDE RANGEL

México D.F.

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

266984



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

*A Victor Andrés y Aura Lucía  
Por entender y compartir el esfuerzo de su madre*

*A Enrique Efraín y Mercedes  
Por enseñarme a luchar para conseguir lo que quiero*

*A Salvador  
Por su constante crítica y su siempre ayuda desinteresada*

*A mis hermanos y sobrinos  
Por compartir nuestros sueños y anhelos*

Esta tesis se llevo a cabo bajo la tutoría de:

Dr. Carlos Larralde

Dr. Enrique Ortega

Dr. Hector Rodríguez

Con la asesoría técnica de:

Dra. Goar Gevorkian

Ing. Tzipe Govezensky

M.C. Alejandro Padilla

Q.F.B. Mónica Viveros

Y el jurado estuvo formado por:

Dr. Jorge Alcocer

Dr. Carlos Rosales

Dr. Carlos Larralde

Dr. Roberto Arreguín

Dr. Armando Isibasi

Agradezco a mis tutores y asesores el tiempo y esfuerzo dedicados al desarrollo de este proyecto.

También quiero agradecer a mi jurado las críticas y sugerencias para la elaboración de esta tesis.

De forma especial quiero agradecer al Dr. Rodríguez por la motivación y al Dr. Larralde por haberme aceptado en su laboratorio para realizar mi sueño.

Reconozco que no hubiera podido lograr el desarrollo de este trabajo si no contara con la beca, que el Instituto Mexicano del Seguro Social me proporcionó durante todo este tiempo.

Además de la asesoría, quiero agradecer a Tzipe, Goar, Ale y Mónica su amistad. Así como también a mis compañeros del laboratorio: Doña Chuy, Nacho, Leonor, Jorge, Miguel, Bernardo, Erika, Luz Ma., Karen, Gonzalo, Claudia, Ana, Juanita y Alberto.

Agradezco a Violeta, Lucy, Blanca, Isabel y al Sr. Pérez de la Mora su amable colaboración en la realización de tantos y tantos trámites.

También agradezco el apoyo de todos mis compañeros del Banco de Sangre y de todos mis compañeros del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Especialmente quiero agradecer a Gabriel Garduño su invaluable ayuda para la corrección del manuscrito.

*Los libros son las abejas que llevan el polen de una inteligencia a otra.*

Sergio Mota

*Pensar es fácil. Actuar es difícil. Actuar siguiendo el pensamiento propio es lo más difícil del mundo.*

Goethe

*Cada amanecer doy las gracias por haber sobrevivido a la noche.  
Cada noche doy las gracias por haber sobrevivido al día.  
(Debiera dar las gracias, es cierto, por sobrevivirme a mí mismo)*

Jaime Sabines

*Tenemos el mal de la melancolía,  
la sed y la rabia, el ruido y las muecas,  
tenemos el agua y, dos veces al día,  
el santo milagro del pan y los peces*

*Tenemos Lolitas, tenemos donjuanés;  
Lennon y McCartney, Gardel y LePera;  
tenemos horóscopos, Biblias y Coranes,  
ramblas en la luna, vírgenes de cera*

*Más de cien palabras, más de cien motivos  
para no cortarse de un tajo las venas,  
más de cien pupilas dónde vernos vivos,  
más de cien mentiras que valen la pena.*

Joaquín Sabina

## RESUMEN

La glucoproteína IIIa (integrina  $\beta_3$ ) es una proteína transmembranal que junto con la glucoproteína IIb (integrina  $\alpha_{IIb}$ ) constituye el clásico receptor de fibrinógeno, y junto con la glucoproteína  $\alpha_V$  el receptor de vitronectina. El receptor  $\alpha_{IIb}\beta_3$  se expresa en la membrana de plaquetas, megacariocitos y células endoteliales y el complejo  $\alpha_V\beta_3$  se expresa en todas las células del mesénquima. Estos receptores forman parte de la familia de las integrinas cuya función es la de comunicar a la célula las señales de activación del exterior hacia el interior de las mismas y como resultado se obtendrán señales del interior de las células hacia el exterior. El complejo IIb-IIIa participa de forma muy importante en la activación plaquetaria para la formación del trombo hemostático.

La púrpura trombocitopénica autoinmune (PTA) es una enfermedad causada por la destrucción excesiva de plaquetas al ser recubiertas por autoanticuerpos dirigidos contra antígenos de la membrana plaquetaria. La destrucción de las plaquetas se lleva a cabo por macrófagos del sistema retículo endotelial. Actualmente no existe un tratamiento adecuado para los pacientes con trombocitopenia severa y persistente.

El antígeno principal de los anticuerpos en la púrpura trombocitopénica autoinmune es la gpIIIa, por tal motivo se seleccionó esta proteína para la predicción de los determinantes antigénicos o epitopos que fijan a los autoanticuerpos responsables de la destrucción plaquetaria. Se quiere saber si estos anticuerpos reconocerán los epitopos en forma de péptidos sintéticos.

Debido a que actualmente no existe un tratamiento eficaz para los pacientes con PTA crónica en el presente proyecto se abordó el problema de la identificación de los posibles epitopos de la gpIIIa responsables de la generación de autoanticuerpos como objetivo principal. Se pensó que los epitopos en forma de péptidos sintéticos además de ofrecer facilidades técnicas para el diagnóstico pueden ser alternativa para el tratamiento.

La predicción de los epitopos se realizó usando la secuencia de aminoácidos de la gpIIIa con el método de Hopp y Woods. La síntesis de los epitopos seleccionados se realizó con una técnica manual usando el método en fase sólida de Merrifield. Esta

técnica manual tiene la ventaja sobre los métodos automatizados de monitorear cada paso de la síntesis.

La denominación y la secuencia de los péptidos sintetizados es la siguiente:

PV-1 (DRKEFAKFEEERARA aa 748-763),

PV-2 (KKFDREPYMTENTC aa 644-657),

PV-3 (GCPQEKEKSFTIKP aa 431-444), y

PV-4 (CSDEALPLGSPRCDLK aa 52-67).



Los anticuerpos anti-péptidos se buscaron tanto en el plasma como en la membrana de las plaquetas de 30 pacientes con PTA crónica y 99 donadores de sangre como grupo control mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Se encontró que en el plasma de los 30 pacientes estudiados el 3.3% (1/30) tuvieron anticuerpos contra el péptido PV-1, el 10% (3/30) contra el péptido PV-2 y el 20% (6/30) contra el péptido PV-3. Ninguno de los 99 plasmas control estudiados reaccionó con estos péptidos a diferencia del péptido PV-4 que reaccionó tanto con los plasmas de los pacientes con PTA como con los plasmas del grupo control, por lo tanto se excluyó a PV-4 como epitopo importante en la PTA.

Por otra parte se encontró que el 65% (58/89) de pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia tipo 1 (VIH-1) tiene anticuerpos contra el péptido PV-1, y que tal reactividad es debida a la reacción cruzada de los anticuerpos anti-gp41 del virus. Es decir gp 41 del VIH-1 tiene una región que presenta homología estructural y antigénica con el péptido PV-1 de gpIIIa.

# INDICE

	PÁGINA
INTRODUCCION	1
Glucoproteína IIIa (integrina $\beta_3$ )	1
Púrpura trombocitopénica autoinmune	3
Plaquetas	6
Aloantígenos plaquetarios	7
Interacciones antígeno-anticuerpo	9
JUSTIFICACION DE LA HIPOTESIS	11
HIPOTESIS	11
OBJETIVO	12
MATERIAL Y METODOS	13
Análisis del perfil antigénico de gpIIIa	13
Síntesis de los péptidos	13
Muestras biológicas	21
Ensayo inmunoenzimático (técnica de ELISA)	22
Técnica de ELISA con competencia	23
Curvas de inhibición en técnica de ELISA	23
Preparación de anticuerpos anti-PV-1 hiperinmunes en Conejo	23
Western blot del suero anti-PV-1	23
RESULTADOS	24
DISCUSION	44
CONCLUSIONES	52
APENDICE I.	
Integrinas	53
APENDICE II	
Glosario de abreviaturas	57
BIBLIOGRAFIA	58

## INTRODUCCION

### GLUCOPROTEINA IIIa ( INTEGRINA $\beta_3$ )

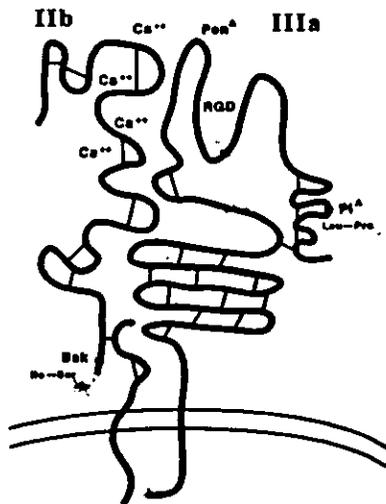
La glucoproteína IIIa (integrina  $\beta_3$ ) es una proteína transmembranal que junto con la glucoproteína IIb (integrina  $\alpha_{IIb}$ ) constituye el clásico receptor de fibrinógeno, además de fibronectina, vitronectina y factor von Willebrand. El complejo IIb-IIIa es conocido también con el nombre CD49/CD61. También junto con la glucoproteína  $\alpha_v$  constituye el clásico receptor de vitronectina además de fibrinógeno fibronectina y factor von Willebrand. El complejo  $\alpha_v\beta_3$  se conoce también con el nombre CD51/CD61. Estos dos receptores pertenecen a la familia de las integrinas, siendo el complejo IIb-IIIa el primer miembro de esta familia que se identificó. Las integrinas son la principal familia de receptores de adhesión de la membrana celular (Albelda S.M. *et al.*, 1990; Clark E.A. *et al.*, 1995).

La gpIIIa tiene un peso molecular calculado a partir de su secuencia de aminoácidos de 84.5 kD, pero el peso molecular real es de 95 kD en condiciones no reductoras y de 110 kD en condiciones reductoras debido a que presenta 6 sitios de N-glicosilación. Tiene 788 aminoácidos que forman tres dominios: un dominio amino-terminal extracitoplasmático (aa 1-680) del cual el péptido líder (aa 1-26) se elimina de la proteína madura, un dominio transmembranal (aa 681-740) y un dominio carboxi-terminal intracitoplasmático (aa 741-788). El dominio extracitoplasmático tiene 4 regiones ricas en cisteínas las cuales forman numerosos puentes disulfuro. El dominio intracitoplasmático tiene dos tirosinas que se fosforilan cuando el receptor une a sus ligandos (Phillips D.R. *et al.*, 1991; Smyth S.S., *et al.*, 1993; Sonnenberg A., 1993).

La estructura primaria de la gpIIIa humana reportada en el banco de secuencias de proteínas SWISS-PROT es la siguiente: (Fitzgerald L.A. *et al.*, 1987; Frachet P., *et al.*, 1990; Zimrin A.B. *et al.*, 1988; Lanza F. *et al.*, 1990; Zimrin A.B. *et al.*, 1990; Hiraiwa A. *et al.*, 1987; Calvete J.J. *et al.*, 1993; Newman P.J. *et al.*, 1989; Wang R. *et al.*, 1992; Kuijpers R.W.A.M. *et al.*, 1993; Wang R. *et al.*, 1993; Loftus J.C. *et al.*, 1990; Bajt M.L. *et al.*, 1992; Lanza F. *et al.*, 1995; Chen Y.P. *et al.*, 1992)

MRARPRPRPL	WVTVLALGAL	AGVGVGGPNI	CTTRGVSSCQ	QCLAVSPMCA
WCSDEALPLG	SPRCDLKENL	LKDNCAPESI	EFPVSEARVL	EDRPLSDKGS
GDSSQVTQVS	PQRIALRLRP	DDSKNFSIQV	RQVEDYPVDI	YYLMDLSYSM
KDDLWSIQNL	GTKLATQMRK	LTSNLRIGFG	AFVDKPVSPY	MYISPPEALE
NPCYDMKTTC	LPMFGYKHVL	TLTDQVTRFN	EEVKKQSVSR	NRDAPEGGFD
AIMQATVCDE	KIGWRNDASH	LLVFTTDAKT	HIALDGRLAG	IVQPNDGQCH
VGSDNHYSAS	TTMDYPSLGL	MTEKLSQKNI	NLIFAVTENV	VNLYQNYSEL
IPGTTVGVL	MDSSNVLQLI	VDAYGKIRSK	VELEVRDLPE	ELSLSFNATC
LNNEVIPGLK	SCMGLKIGDT	VSFSIEAKVR	GCPQEKEKSF	TIKPVGFKDS
LIVQVTFDCD	CACQAQAEPN	SHRCNNGNGT	FECGVCRCGP	GWLGSQCECS
EEDYRPSQQD	ECSREGQPV	CSQRGECLCG	QCVCHSSDFG	KITGKYCEDD
DFSCVRYKGE	MCSGHGQCSC	GDCLCDSWT	GYCNCCTTRT	DTCMSSNGLL
CSGRGKCECG	SCVCIQPGSY	GDTCEKCPTC	PDACTFKKEC	VECKKFDREP
YMTENTCNRY	CRDEIESVKE	LKDTGKDAVN	CTYKNEDDCV	VRFQYYEDSS
GKSILYVVEE	PECPKGPDIL	VLLSYMGAI	LLIGLAALLI	WKLLITHDR
KEFAKFEER	ARAKWDTANN	PLYKEATSTF	TNITYRGT	

Todavía no se conoce la estructura cristalográfica de esta proteína pero se ha propuesto un modelo tridimensional de su estructura a partir de su estructura primaria. A continuación se presenta un modelo del receptor IIb-IIIa (integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ).



*GpIIb-IIIa (integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ). Se muestra los sitios que unen  $Ca^{++}$ , el polimorfismo en gpIIb, el sitio de unión con el ligando y el polimorfismo de gpIIIa (Newman P.J., 1991).*

El gene de gpIIIa se localiza en el cromosoma 17 q21-q23 y el complejo IIb-IIIa está expresado en la membrana de las plaquetas, megacariocitos y células endoteliales. Este complejo está presente en aproximadamente 40 000 copias en la membrana de las plaquetas y 40 000 copias más en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas en reposo. Cuando se activan las plaquetas las copias presentes en los gránulos  $\alpha$  se mueven hacia la membrana. El receptor  $\alpha$ V $\beta$ 3 se expresa en la membrana de plaquetas, células endoteliales osteoclastos y otros tipos celulares. La densidad de este receptor en las plaquetas es de sólo 50 a 100 copias (Sonnenber A., 1993).

### **PURPURA TROMBOCITOPENICA AUTOINMUNE**

La púrpura trombocitopénica autoinmune (PTA) es una enfermedad causada por la destrucción excesiva de plaquetas al ser recubiertas por autoanticuerpos dirigidos contra antígenos de la membrana plaquetaria. La destrucción de plaquetas se lleva a cabo por macrófagos del sistema retículo endotelial (Wendell F.R., 1983; McMillan R., 1983; Pizzuto J. *et al.*, 1984; James N.G., 1994; Schwartz R.S., 1993).

Mediante el empleo de diversas técnicas de laboratorio se ha podido demostrar la presencia de autoanticuerpos en el suero de los pacientes con PTA hasta en el 80% de los casos. La mayoría de los anticuerpos están dirigidos contra epitopos de las glucoproteínas de la membrana plaquetaria, principalmente el complejo GPIIb-IIIa; otros anticuerpos actúan sobre epitopos de las glucoproteínas Ib-IX, Ia-IIa, IV y V. En la mayoría de los pacientes se encuentran mezclas de anticuerpos que reaccionan con más de una glucoproteína.(van Leeuwen E.F. *et al.*, 1982; Beardsley D.S. *et al.*, 1984; Tsubakio T., *et al.*, 1987; Kekomaki R. *et al.*, 1991; Fujisawa K. *et al.*, 1991; Fujisawa K. *et al.*, 1992; Fujisawa K. *et al.*, 1993; James N.G. *et al.*, 1994)

La presencia de anticuerpos antiplaqueta fue demostrada por vez primera por Harrington *et al.* en el año de 1951. La clase de inmunoglobulina involucrada es IgG en el 92% de los casos, siendo la subclase IgG1 la más frecuente (82%). Se ha demostrado la fijación de complemento hasta C3b en casos muy raros (Mollison P., 1993; Shulman N.R. *et al.*, 1987).

La importancia de los anticuerpos antiplaqueta en la fisiopatología de la enfermedad es controversial; sin embargo, en general se está de acuerdo en que el título de estos anticuerpos disminuye en pacientes que están en remisión completa y aumentan en periodos de recurrencia de la enfermedad (Berchtold P. *et al.*, 1993; Fujisawa K. *et al.*, 1993 ).

La PTA puede ser primaria (idiopática) y secundaria. La PTA primaria se presenta como una enfermedad única , la secundaria está relacionada con otras enfermedades como el lupus eritematoso sistémico (LES), neoplasias, infecciones bacterianas, infecciones virales como en el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), etc. (Kelton J. *et al.*, 1982; Karpatkin S. *et al.*, 1985; Waters A.H., 1992 Oksenhendler E. *et al.*, 1993; Godeau B. *et al.*, 1993) y también al uso de drogas como la quinidina, quinina, heparina, etc. (Aster R.H., 1994).

Entre los adultos la PTA idiopática afecta principalmente a las mujeres: aproximadamente el 72% de todos los pacientes son del sexo femenino. En la mayoría de estos casos la enfermedad es insidiosa, crónica, recurrente, con episodios de remisión. En los niños en cambio, generalmente se presenta después de una enfermedad viral y afecta a ambos sexos por igual, se inicia abruptamente y remite espontáneamente en el 80% de los casos (James N.G., 1994; Karpatkin S., 1985; Aster R.H., 1994).

El diagnóstico de PTA se basa en la historia clínica, el examen físico, la biometría hemática y la observación del extendido de la sangre periférica. El cuadro clínico común es la presencia de síndrome hemorrágico. De este síndrome hemorrágico la púrpura, 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 (McVerry B.A., 1985 ). En la biometría hemática el dato principal es una cuenta baja de plaquetas con el resto de los parámetros en cifras normales. Para muchos investigadores clínicos la observación del extendido de sangre periférica es muy importante ya que proporciona información sobre el tamaño y morfología de plaquetas, eritrocitos y leucocitos, eliminando de esta manera otras posibles causas de plaquetopenia (James N.G., *et al.*, 1996).

En general se está de acuerdo en que el tratamiento de la PTA depende de la cifra de plaquetas. Se ha observado que cuando los pacientes tienen  $50 \times 10^9$  plaquetas/L o más y no presentan complicaciones hemorrágicas, no requieren tratamiento específico. La prednisona a dosis de 1-2 mg/K de peso es el tratamiento convencional de inicio para aquellos pacientes que tienen menos de  $30 \times 10^9$  plaquetas/L con y sin manifestaciones hemorrágicas. Usando este esquema de tratamiento, aproximadamente dos tercios de los pacientes incrementan su cuenta de plaquetas por arriba de  $50 \times 10^9$ /L, dentro de la primera semana de tratamiento; pero la mayoría de los pacientes recaen al reducir la dosis. ( Lichtin A., 1996; Mc Verry B.A., 1985; Boumpas D.T. *et al.*, 1993) La prednisona es una hormona pleiotrópica (glucocorticoide) que modula la respuesta inmune, interfiriendo las funciones de los leucocitos, células endoteliales y fibroblastos. Disminuye la producción y función de los anticuerpos. Pero a grandes dosis tiene efectos colaterales adversos, como hiperglicemia, hipertensión arterial, síndrome de Cushing, osteoporosis, gastritis, etc. (Boumpas D.T. *et al.*, 1993).

Como la destrucción de las plaquetas se lleva a cabo por los macrófagos del sistema retículo endotelial, principalmente en el bazo, la esplenectomía se reserva para aquellos pacientes que no reaccionan al tratamiento con esteroides. Con la esplenectomía se logra remisión completa en alrededor de dos tercios de los pacientes.

Un importante problema que no se ha podido resolver es el tratamiento de aquellos pacientes con trombocitopenia severa y persistente a pesar de la prednisona y la esplenectomía. Se ha publicado numerosas opciones de tratamiento por diferentes grupos de investigadores; como son el uso de inmunosupresores (azatioprina), gammaglobulina anti-D endovenosa a dosis altas, gammaglobulina anti-D a dosis bajas en forma de eritrocitos opsonizados; todas ellas con éxito relativo. Los resultados de algunos de estos esquemas de tratamiento no se han logrado reproducir por otros grupos, o bien sólo se observa remisión transitoria (Andersen J.C., 1994; Giovanni E. *et al.*, 1996; Lichtin A., 1996; Ambriz R. *et al.*, 1987; Letsky E.A. *et al.*, 1996).

## PLAQUETAS

Las plaquetas son producto de la desintegración del citoplasma de los megacariocitos de la médula ósea. Se les llama también trombocitos, por el papel que tienen en la formación del trombo hemostático. La participación de la plaqueta en la formación del coágulo es muy importante. Mediante sus receptores de membrana (complejos glucoproteicos GP IIb-IIIa y GP Ib-IX) la plaqueta se adhiere a los endotelios dañados a través de proteínas plasmáticas como el fibrinógeno, factor Von Willebrand y fibronectina. Posteriormente y como consecuencia de la activación de estos receptores, ocurren cambios bioquímicos en el citoplasma plaquetario como son; la fosforilación en tirosina de varias cinasas de tirosina como src, fyn y fak, lo que conduce a la activación de fosfolipasa C, formación de trifosfato de inositol, diacilglicerol, flujo de  $Ca^{++}$  y fosforilación de proteínas contráctiles dependientes de ATP. Todos estos eventos se expresan en un cambio en la forma y estructura de las plaquetas dando lugar a la formación de grandes agregados plaquetarios. Se secretan sustancias vasoactivas (serotonina) y agregantes (TXA<sub>2</sub>, ADP), entre otras, lo que finalmente permite el reclutamiento y activación de mayor número de plaquetas (Kroll M.H. *et al.*, 1989; Ferrell J.E. *et al.*, 1989; Golden A. *et al.*, 1990; Kouns W.C. *et al.*, 1991; Hynes R.O., 1991; Sultan C. *et al.*, 1991; Clark E. A., *et al.*, 1994; Calvete J.J., 1994; Shattil S.J., *et al.*, 1994; Rittenhouse S.E., 1996; Shattil S.J. *et al.*, 1997; Levy-Toledano S. *et al.*, 1997).

Además de los cambios de forma en la plaqueta, durante la formación del trombo ocurre la exposición de fosfolípidos de la membrana que actúan como parte de los complejos enzimáticos de la coagulación, como son los complejos diezasa (factor IX- $Ca^{++}$ -fosfolípidos plaquetarios y factor VII- $Ca^{++}$ -fosfolípidos plaquetarios) y protrombinasa (factor X- $Ca^{++}$ -fosfolípidos plaquetarios). El complejo-protrombinasa convierte a la protrombina en trombina, la cual actúa sobre el fibrinógeno, liberando un péptido de cada una de las dos cadenas  $\alpha$  y un péptido de cada una de las dos cadenas  $\beta$  del mismo, dejando una molécula de fibrinógeno con diferente polaridad. Varias moléculas de fibrinógeno ahora llamadas monómeros de fibrina se polimerizan para formar la malla de fibrina. De esta forma la fibrina se deposita sobre estos agregados plaquetarios. Posteriormente las mismas plaquetas

## PLAQUETAS

Las plaquetas son producto de la desintegración del citoplasma de los megacariocitos de la médula ósea. Se les llama también trombocitos, por el papel que tienen en la formación del trombo hemostático. La participación de la plaqueta en la formación del coágulo es muy importante. Mediante sus receptores de membrana (complejos glucoproteicos GP IIb-IIIa y GP Ib-IX) la plaqueta se adhiere a los endotelios dañados a través de proteínas plasmáticas como el fibrinógeno, factor Von Willebrand y fibronectina. Posteriormente y como consecuencia de la activación de estos receptores, ocurren cambios bioquímicos en el citoplasma plaquetario como son; la fosforilación en tirosina de varias cinasas de tirosina como src, fyn y fak, lo que conduce a la activación de fosfolipasa C, formación de trifosfato de inositol, diacilglicerol, flujo de  $Ca^{++}$  y fosforilación de proteínas contráctiles dependientes de ATP. Todos estos eventos se expresan en un cambio en la forma y estructura de las plaquetas dando lugar a la formación de grandes agregados plaquetarios. Se secretan sustancias vasoactivas (serotonina) y agregantes (TXA<sub>2</sub>, ADP), entre otras, lo que finalmente permite el reclutamiento y activación de mayor número de plaquetas (Kroll M.H. *et al.*, 1989; Ferrell J.E. *et al.*, 1989; Golden A. *et al.*, 1990; Kouns W.C. *et al.*, 1991; Hynes R.O., 1991; Sultan C. *et al.*, 1991; Clark E. A., *et al.*, 1994; Calvete J.J., 1994; Shattil S.J., *et al.*, 1994; Rittenhouse S.E., 1996; Shattil S.J. *et al.*, 1997; Levy-Toledano S. *et al.*, 1997).

Además de los cambios de forma en la plaqueta, durante la formación del trombo ocurre la exposición de fosfolípidos de la membrana que actúan como parte de los complejos enzimáticos de la coagulación, como son los complejos diezasa (factor IX- $Ca^{++}$ -fosfolípidos plaquetarios y factor VII- $Ca^{++}$ -fosfolípidos plaquetarios) y protrombinasa (factor X- $Ca^{++}$ -fosfolípidos plaquetarios). El complejo-protrombinasa convierte a la protrombina en trombina, la cual actúa sobre el fibrinógeno, liberando un péptido de cada una de las dos cadenas  $\alpha$  y un péptido de cada una de las dos cadenas  $\beta$  del mismo, dejando una molécula de fibrinógeno con diferente polaridad. Varias moléculas de fibrinógeno ahora llamadas monómeros de fibrina se polimerizan para formar la malla de fibrina. De esta forma la fibrina se deposita sobre estos agregados plaquetarios. Posteriormente las mismas plaquetas

realizan la retracción del coágulo para darle mayor firmeza (Martínez M.C. *et al.*, 1996; Williams R. *et al.*, 1994). Si por alguna razón disminuye la cantidad de plaquetas o se inhibe la función de las glucoproteínas de adhesión ( en este caso por autoanticuerpos) a tal grado de no participar en el proceso hemostático normal, la consecuencia será la manifestación clínica de sangrado.

## ALOANTIGENOS PLAQUETARIOS

Las plaquetas poseen antígenos comunes a otras células, como son los antígenos proteicos del sistema HLA ("human leukocyte antigens") que comparten con los leucocitos, y los antígenos polisacáridos de los sistemas sanguíneos ABO, Lewis, Ii y P que comparten con los eritrocitos. Los aloantígenos propios de las plaquetas están agrupados en sistemas. Los principales sistemas son los HPA ("human platelet antigens") y reúnen a una serie de antígenos que anteriormente eran nombrados de forma arbitraria. Como ya se mencionó previamente los aloanticuerpos contra estos antígenos están involucrados en púrpura post-transfusional y trombocitopenia neonatal aloinmune (Mollison P.L. 1993; Newman P.J. 1991; Honda S. *et al.*, 1995; Maslanka K. *et al.*, 1996; Skogen B. *et al.*, 1996)

### I) Sistema HPA-1

Este sistema tiene dos antígenos: 1) el HPA-1a, llamado  $Zw^a$  por van Loghem, su descubridor, en el año de 1959. Este antígeno también fue descrito por Shulman en 1961, pero lo denominó  $PLA^1$ . 2) el otro antígeno es el HPA-1b, llamado  $Zw^b$  por van der Weerd y  $PLA^2$  por Shulman. HPA-1a ( $leu_{33}$ ) y HPA-1b ( $pro_{33}$ ) son alelos y se localizan en la glucoproteína IIIa.

### II) Sistema HPA-2

Este sistema tiene dos antígenos el HPA-2a, llamado Ko por van der Weerd en 1962 y  $Sib^a$  por Saji en 1989. HPA-2a ( $tre_{145}$ ) y HPA-2b ( $met_{145}$ ) son alelos y se localizan en la glucoproteína Ib.

### III) Sistema HPA-3

A este sistema se le habían dado los nombres Bak y Lek (von der Borne en 1980 y Boizard y Wautier en 1984, respectivamente). HPA-3a (ileu<sub>843</sub>) y HPA-3b (ser<sub>843</sub>) son alelos y se localizan en la glucoproteína IIb

### IV) Sistema HPA-4

Este sistema se conocía con los nombres Pen y Yuk (Friedman y Aster en 1985 y Shibata en 1986, respectivamente). HPA-4a (arg<sub>526</sub>) y HPA-4b (glu<sub>526</sub>) son alelos y se localizan en la glucoproteína IIIa

### V) Sistema HPA-5

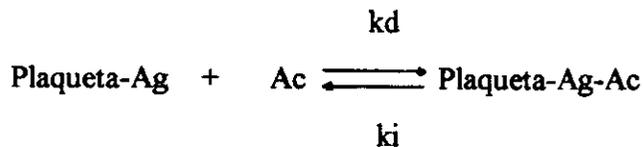
Este sistema lo describió por primera vez Kiefel en 1988, llamándolo Br, Smith en 1989 lo llamó Zav y Woods en 1989 lo llamó Hc. Se localiza en la glucoproteína Ia-IIa (VLA-2) ( $\alpha_1$ - $\beta_2$ ).

#### *Principales sistemas antigénicos plaquetarios*

Sistema	Antígenos	Nombres Arbitrarios	Polimorfismo	Localización
HPA-1	HPA-1 <sup>a</sup>	PL <sup>A1</sup> Zw <sup>a</sup>	leu33	gpIIIa
	HPA-1b	PL <sup>A2</sup> Zw <sup>b</sup>	pro33	
HPA-2	HPA-2 <sup>a</sup>	Ko <sup>a</sup> Sib <sup>a</sup>	tre145	gpIb
	HPA-2b	Ko <sup>b</sup> Sib <sup>b</sup>	met145	
HPA-3	HPA-3 <sup>a</sup>	Bak <sup>a</sup> Lek <sup>a</sup>	ileu843	gpIIb
	HPA-3b	Bak <sup>b</sup> Lek <sup>b</sup>	ser843	
HPA-4	HPA-4 <sup>a</sup>	Pen <sup>a</sup> Yuk <sup>a</sup>	arg526	gpIIIa
	HPA-4b	Pen <sup>b</sup> Yuk <sup>b</sup>	glu526	
HPA-5	HPA-5 <sup>a</sup>	Br <sup>a</sup> Zav <sup>a</sup> Hc <sup>a</sup>		gpIa-IIb
	HPA-5b	Br <sup>b</sup> Zav <sup>b</sup> Hc <sup>b</sup>		

## INTERACCIONES ANTIGENO-ANTICUERPO

Independientemente que la PTA sea primaria o secundaria, los anticuerpos reaccionan con los antígenos para formar los complejos Ag-Ac, como se representa en la siguiente ecuación:



A esta ecuación se le aplica la ley de acción de masas para obtener:

$$K = \frac{k_d}{k_i} = \frac{[\text{Plaqueta-Ag-Ac}]}{[\text{Plaqueta-Ag}] [\text{Ac}]}$$

donde K es la constante en el equilibrio (o constante de afinidad)

$k_d$  es la constante de formación del complejo

$k_i$  es la constante de disociación del complejo

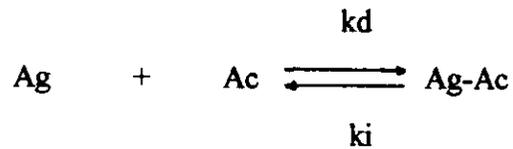
$[\text{Plaqueta-Ag-Ac}]$  es la concentración en el equilibrio del complejo Plaqueta-Ag-Ac

$[\text{Plaqueta-Ag}]$  es la concentración en el equilibrio de los antígenos de las plaquetas

$[\text{Ac}]$  es la concentración en el equilibrio de los anticuerpos libres

Con la ecuación anterior sería muy difícil poder calcular la constante K, ya que en el complejo Plaqueta-Ag-Ac hay muchas variables que no se pueden controlar, como son el número de antígenos presentes en la plaqueta, el número de moléculas de anticuerpo que se unen a estos antígenos, y si una molécula de anticuerpo puede unirse a un antígeno en una plaqueta por una región Fab y con la otra región Fab a otra plaqueta, lo que daría lugar a la formación de agregados plaquetarios con diferentes tamaños.

En cambio si se cuenta con el antígeno en forma monovalente, un epitopo, la ecuación se vuelve más sencilla:



$$K = \frac{[\text{Ag-Ac}]}{[\text{Ag}] [\text{Ac}]}$$

Las concentraciones del complejo [Ag-Ac], del antígeno libre [Ag] y del anticuerpo libre [Ac] se pueden medir, y por lo tanto K se puede calcular.

El principal problema radica en conocer cuáles son los epitopos plaquetarios contra los que existen anticuerpos en los pacientes con PTA, una vez identificados los epitopos podrían ser producidos en forma sintética y entonces se mediría fácilmente la constante de afinidad de los anticuerpos antiplaqueta.

## JUSTIFICACION DE LA HIPOTESIS

Como se ha mencionado, la glucoproteína IIIa (integrina  $\beta_3$ ) es una proteína fundamental, ya que junto con la cadena  $\alpha_{IIb}$  constituyen el receptor de proteínas plasmáticas de adhesión (fibrinógeno, fibronectina, vitronectina y factor von Willebrand). Este receptor participa en forma muy importante en la activación plaquetaria del proceso hemostático de la sangre. Y como además es el blanco principal de los autoanticuerpos en la púrpura trombocitopénica autoinmune se seleccionó para la predicción de los determinantes antigénicos involucrados en la producción de autoanticuerpos responsables de la destrucción plaquetaria en la púrpura trombocitopénica autoinmune.

## HIPOTESIS

Se sabe que los pacientes con púrpura trombocitopénica autoinmune tienen anticuerpos dirigidos contra la glucoproteína IIIa (integrina  $\beta_3$ ), se quiere saber si estos anticuerpos reconocerán antígenos de la proteína en forma de péptidos sintéticos.

## JUSTIFICACION DE LA HIPOTESIS

Como se ha mencionado, la glucoproteína IIIa (integrina  $\beta_3$ ) es una proteína fundamental, ya que junto con la cadena  $\alpha_{IIb}$  constituyen el receptor de proteínas plasmáticas de adhesión (fibrinógeno, fibronectina, vitronectina y factor von Willebrand). Este receptor participa en forma muy importante en la activación plaquetaria del proceso hemostático de la sangre. Y como además es el blanco principal de los autoanticuerpos en la púrpura trombocitopénica autoinmune se seleccionó para la predicción de los determinantes antigénicos involucrados en la producción de autoanticuerpos responsables de la destrucción plaquetaria en la púrpura trombocitopénica autoinmune.

## HIPOTESIS

Se sabe que los pacientes con púrpura trombocitopénica autoinmune tienen anticuerpos dirigidos contra la glucoproteína IIIa (integrina  $\beta_3$ ), se quiere saber si estos anticuerpos reconocerán antígenos de la proteína en forma de péptidos sintéticos.

## OBJETIVO

Encontrar el epitopo ó epitopos de la gpIIIa involucrados en la producción de autoanticuerpos en los pacientes con PTA.

Para lograr este objetivo se realizaron las siguientes acciones:

- 1) Predicción de epitopos a partir de la estructura primaria de gpIIIa.
- 2) Preparación de los epitopos en forma de péptidos sintéticos.
- 3) Investigación de la reactividad de los anticuerpos presentes en el plasma de los pacientes con PTA con los péptidos sintéticos.
- 4) Investigación de la reactividad de los anticuerpos presentes en las membranas de las plaquetas de los pacientes con PTA con los péptidos sintéticos.
- 5) Correlación de la presencia de anticuerpos reactivos con los péptidos sintéticos y los datos clínicos de los pacientes con PTA.

Si la hipótesis es verdadera, es decir, si los pacientes con PTA tienen anticuerpos dirigidos contra péptidos sintéticos de la gpIIIa, el uso de péptidos sintéticos podría ser una herramienta útil para:

- 1) Apoyar el diagnóstico de la enfermedad, ya que actualmente no hay técnicas de laboratorio que certifiquen el diagnóstico.
- 2) Explorar el rango y variables que afectan la constante de afinidad de estos anticuerpos en el transcurso de la enfermedad.
- 3) Evaluar si la concentración o el cambio en la constante de afinidad de los anticuerpos puede ser usado como valor pronóstico de la enfermedad.
- 4) Evaluar como posibilidad terapéutica el uso de los péptidos sintéticos para interferir la unión de los anticuerpos y plaquetas.

## MATERIAL Y METODOS

### ANALISIS DEL PERFIL ANTIGENICO DE gpIIIa (INTEGRINA $\beta_3$ )

Se buscó la secuencia de aminoácidos de la gpIIIa en el banco de secuencias de proteínas SWISS-PROT (Fitzgerald L.A. *et al.*, 1987; Frachet P. *et al.*, 1990; Zimrin A.B. *et al.*, 1988; Lanza F. *et al.*, 1990; Zimrin A.B. *et al.*, 1990; Hiraiwa A. *et al.*, 1987; Calvete J.J. *et al.*, 1991; Newman P.J. *et al.*, 1989; Wang R. *et al.*, 1992; Kuijpers R.W.A.M. *et al.*, 1993; Wang R. *et al.*, 1993; Loftus J.C. *et al.*, 1990; Bajt M.L. *et al.*, 1992; Lanza F. *et al.*, 1995; Chen Y.P. *et al.*, 1992).

Analizando la secuencia de la gpIIIa con el programa ANTIGEN del PC/GENE (Intelligenetics, Inc/GENOFIT SA), se hizo la predicción de los determinantes antigénicos (epitopos). Este programa emplea el método de Hopp y Woods (Hoop T.P. *et al.*, 1981; Hopp T.P., 1993). Este programa recomienda que la predicción se realice con una ventana de 6 aminoácidos. Dicha recomendación se observó sistemáticamente, péptidos de esta longitud tienen que acoplarse a alguna proteína para realizar los ensayos inmunológicos, por tal motivo se prolongó la longitud de los péptidos hasta 14 ó 15 aminoácidos, incluyendo secuencias hacia los extremos amino y carboxi terminal. Por experiencia previa del laboratorio (Gevorkian G. *et al.*, 1996) los péptidos de estas longitudes no necesitan ser acoplados a ninguna proteína.

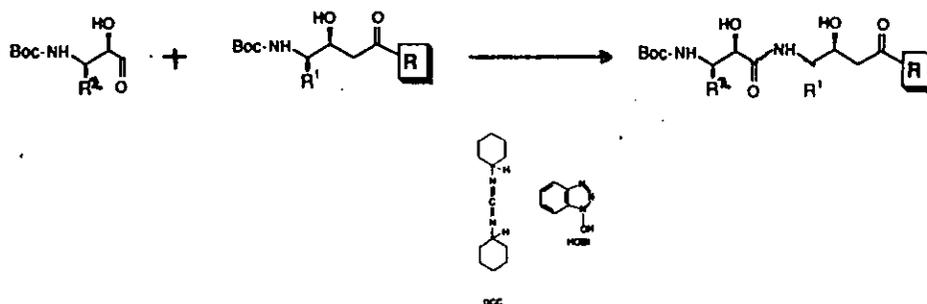
Se seleccionaron los tres epitopos que el programa marcó como más hidrofílicos y se decidió incluir otro epitopo más, este epitopo es la secuencia que incluye al antígeno PL<sup>A1</sup> (HPA-1a). Anticuerpos anti-PL<sup>A1</sup> son responsables de púrpura aloimmune. Como ya se mencionó en la introducción, el antígeno PLA-1 pertenece al principal sistema de aloantígenos plaquetarios: el sistema HPA-1 (Newman P.J., 1991).

### SINTESIS DE LOS PEPTIDOS

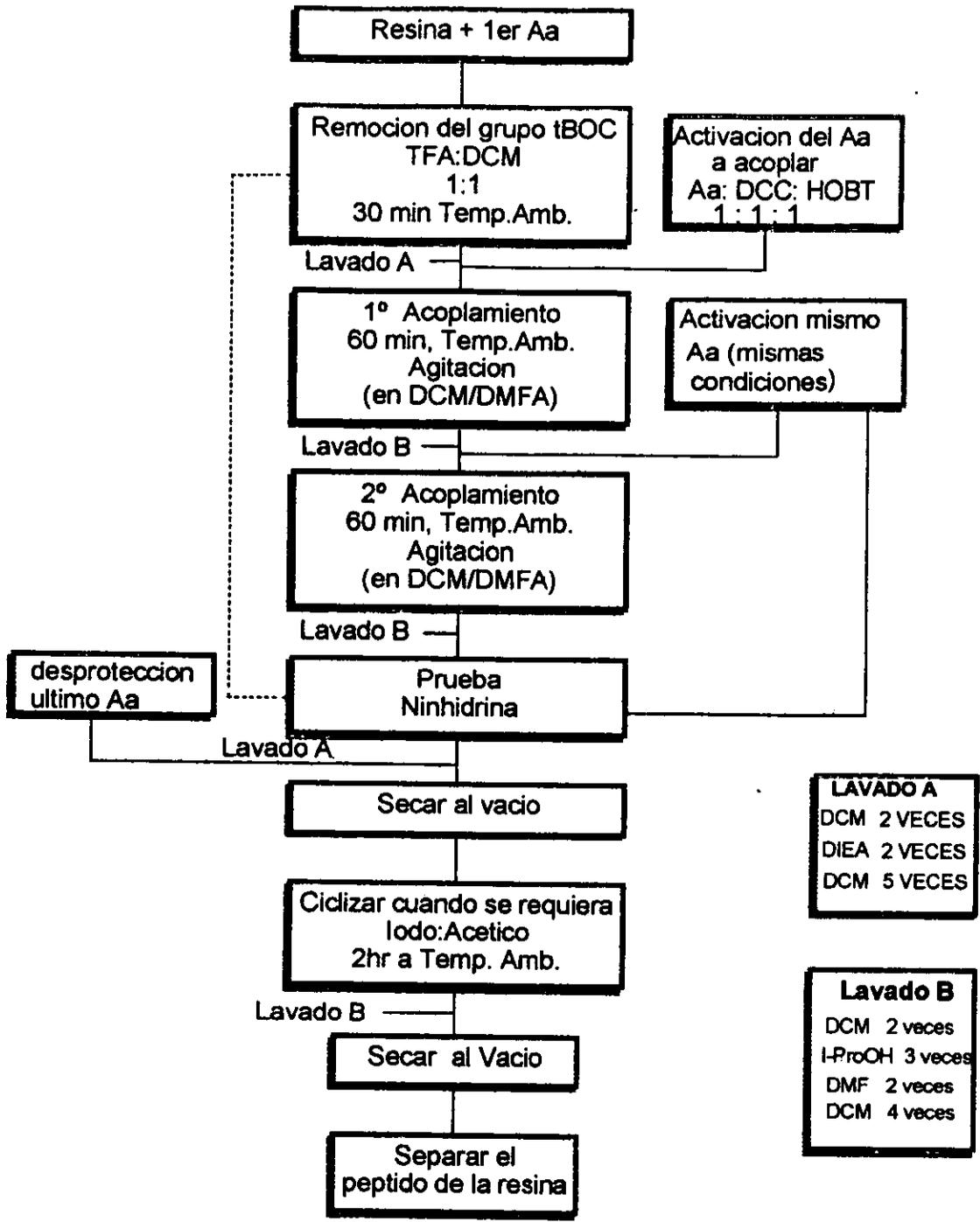
Los péptidos se sintetizaron con el método de Merrifield en fase sólida (Merrifield R.B., 1963) con estrategia Boc. En esta estrategia todos los aminoácidos, incluso el acoplado a la resina están protegidos en el grupo amino del carbono alfa con el grupo Boc

(t-Butoxicarbonil). En forma general el método para la síntesis peptídica se realiza de acuerdo al siguiente esquema:

Se selecciona una resina que ya tenga acoplado el aminoácido carboxi-terminal y a partir de aquí se van acoplando cada uno de los aminoácidos hasta terminar con el aminoácido amino-terminal. Primero se realiza la remoción del grupo Boc para dejar libre el grupo amino. El grupo Boc se remueve con ácido trifluoroacético (TFA)/ diclorometano (DCM) al 50% (V/V) primero durante 2 min a temperatura ambiente, se desecha el TFA y después se agrega más TFA. Se deja 30 minutos más. Se lava cinco veces la resina con DCM, y se neutraliza con diisopropil-etil-amina (DIEA) /DCM al 10% (V/V) durante un minuto y una segunda vez durante dos minutos. Se vuelve a lavar cinco veces más con DCM. El acoplamiento (ver reacción) se realizó de la siguiente manera: se disuelven el aminoácido, la dicitclohexilcarbodiimida (DCC) en DCM y el hidroxibenzotriazol (HOBT) (éstos dos son activadores del grupo carbonilo que se va a unir al grupo amino libre) con DMF. Se agregan todos estos reactivos al vaso de reacción y se deja que se realice el acoplamiento a temperatura ambiente y con agitación suave, durante 60 minutos. Se lava cinco veces con DCM, tres veces con isopropanol (Este lavado con isopropanol es muy importante pues la dicitclohexilurea formada durante el acoplamiento es soluble en isopropanol, y es la única forma de eliminarla) y finalmente cinco veces más con DCM. Cada aminoácido se acopla de dos a tres veces, de acuerdo con el resultado de la prueba de ninhidrina (Zlatkis A., *et al.*, 1978).



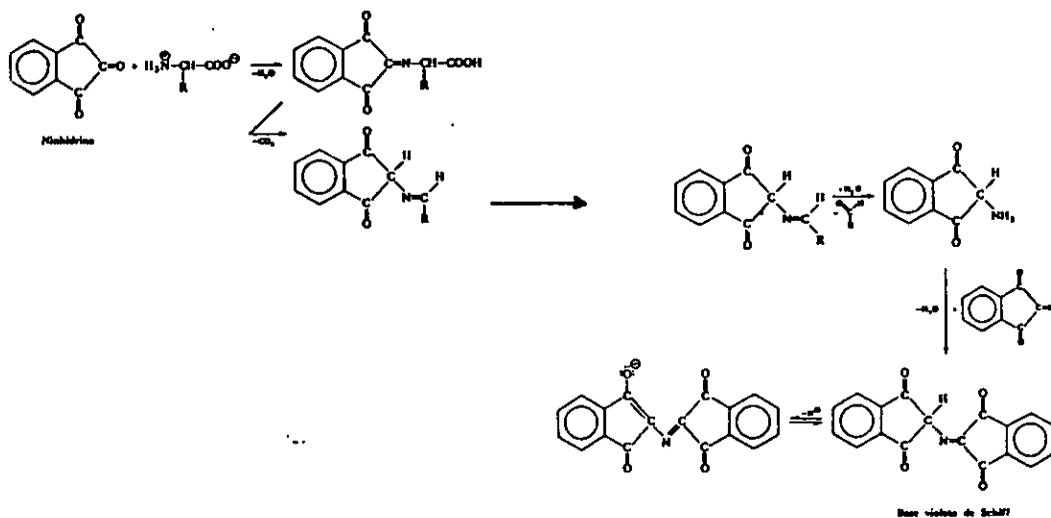
**Reacción de acoplamiento del segundo aminoácido. El primer aminoácido está ya unido a la resina. Cada uno de los siguientes aminoácidos se acopla siguiendo la misma reacción**



*Esquema general de la síntesis de péptidos por el método de Merrifield en fase sólida*

## Prueba de la ninhidrina (Kaiser et al 1970)

La prueba de ninhidrina se realizó antes y después de cada proceso de acoplamiento. Es una reacción cualitativa que indica claramente la presencia de grupos amino libres. Se toma un poco de la resina y se coloca en un vial de vidrio, se agrega una gota de fenol, una gota de piridina y una gota de ninhidrina, se calienta un minuto y se observa la reacción. Los grupos amino libres forman un compuesto de color azul con la ninhidrina de acuerdo con la siguiente reacción ( Zlatkis A. *et al.*, 1978):



Un color azul oscuro indica una reacción positiva para aminas primarias; por el contrario un color amarillo indica una reacción negativa. Un color azul claro o azul verde indica una reacción de acoplamiento incompleta. Es importante mencionar que la prolina que no tiene el grupo amino libre, da un color rojo con la ninhidrina, pero también otros aminoácidos como asp, asn, glu, gln, his y cys pueden algunas veces dar color rojo o café, y en estos casos no se pueden hacer conclusiones correctas acerca de cómo ocurrió el acoplamiento (Pennington M.W. *et al.*, 1994).

Se repite el mismo procedimiento para cada uno de los aminoácidos. A partir del acoplamiento del quinto aminoácido la DMF se sustituye por  $\text{NaClO}_4$  0.4M en DCM/DMF V/V, y antes de agregar el aminoácido se lava una vez con esta solución de perclorato de sodio (éste ayuda a evitar que se formen agregados de los aminoácidos dentro y entre las cadenas polipeptídicas). Cuando se ha acoplado el último aminoácido, se remueve el grupo Boc y se procede a separar el péptido de la resina. Dependiendo de la composición en aminoácidos y de los grupos protectores de las cadenas laterales se definirá en cada péptido las condiciones óptimas.

### **Péptido PV-1**

La secuencia de este péptido es: **DRKEFAKFEEERARA** (aa 749-763) y se localiza en la región intracitoplasmática de la GPIIIa. Se empezó con 500 mg de la resina: Nt Boc L-Alanina, que tiene 0.44 mmol/g de Nt Boc-alanina. Se emplearon 0.44 mmol de cada aminoácido. Los aminoácidos empleados son los siguientes:

Nt Boc-Nw-tosil L-arginina

Nt Boc L-alanina

Nt Boc L-ácido glutámico  $\gamma$ -bencil éster

Nt Boc L-fenilalanina

Nt Boc -N $\epsilon$ -(-z-cloro-CBZ) L-lisina

Nt Boc L-ácido aspártico  $\beta$ -bencil éster

Para activar el grupo carbonil se usó 0.44 mmol de DCC y 0.44 mmol de HOBT

Para separar el péptido de la resina se usó la técnica de Tam J.P. *et al.*, 1986.

Debido a que el péptido tiene arginina protegida con tosil se necesitó hacer la desprotección en condiciones "fuertes" de acidez, para lo cual se puso la resina en un vaso de reacción previamente colocado en un baño de hielo con sal, para evitar que la temperatura se eleve. Se agregó 1 ml de m-cresol, 8 ml de TFA conc. y 1 ml de TFMSA, se dejó en agitación durante 3.5 horas en el baño de hielo y después 30 minutos más a temperatura ambiente. Se filtró y se lavó la resina con TFA concentrado para recuperar la mayor cantidad de péptido. El filtrado (que tiene el péptido) se recolectó en un matraz sumergido en un baño de

acetona-hielo seco. Se agregó 200 ml de éter anhidro previamente enfriado para precipitar el péptido, agregando 0.5 ml de piridina para favorecer la precipitación, después se dejó en el refrigerador hasta el día siguiente, para precipitar la mayor cantidad de péptido. Se filtró, lavando el precipitado con éter frío y se secó al vacío. Para eliminar las sales formadas en la reacción de separación del péptido de la resina el precipitado se disolvió en ácido acético 0.1M y se pasó por una columna de Sephadex G-25 (2.5 x 16 cm) eluyendo el péptido con ácido acético 0.1 M. Después de la elusión, el péptido se liofilizó durante 24 horas.

### **Péptido PV-2**

La secuencia de este péptido es: **KKFDREPYMTENTC (aa 644-657)** y se localiza en la región extracitoplasmática, después de la región rica en cisteínas. Se empezó con 500 mg de la resina : Nt Boc-S- (p-metoxibencil)-L-cisteína, que tiene 0.36 mmol/g de Nt Boc-cisteína. Se emplearon 0.36 mmol de cada aminoácido. Los aminoácidos empleados son los siguientes:

Nt Boc -o-bencil L-treonina

Nt Boc -p-nitrofenil ester L-asparagina

Nt Boc L-ácido glutámico  $\gamma$ -bencil ester

Nt Boc L -metionina (o)

Nt Boc (-o- 2,6 diclorobencil) L-tirosina

Nt Boc L-prolina

Nt Boc Nw-tosil L-arginina

Nt Boc L-ácido aspártico  $\beta$ -bencil ester

Nt Boc L-fenilalanina

Nt Boc -N $\epsilon$ -(z-cloro-CBZ) L-lisina

Para activar el grupo carbonil se usó 0.36 mmol de DCC y 0.36 mmol de HOBT

Debido a que también hay en este péptido arginina protegida con el grupo tosil, para separarlo de la resina, se siguió la técnica descrita anteriormente.

### **Péptido PV-3**

La secuencia de este péptido es: **GCPQEKEKSFTIKP (aa 431-444)** y se localiza en la región extracitoplasmática, antes de la región rica en cisteínas. Se empezó con 500 mg de la resina: Nt Boc L-prolina , que tiene 0.54 mmol/g de Nt Boc-prolina. Se emplearon 0.54 mmol de cada aminoácido. Los aminoácidos empleados son los siguientes.

Nt Boc -Ne-(z-cloro-CBZ) L-lisina

Nt Boc L-isoleucina

Nt Boc -o-bencil-treonina

Nt Boc L-fenilalanina

Nt Boc -o-bencil L-serina

Nt Boc L-ácido glutámico  $\gamma$ -bencil ester

Nt Boc-p-nitrofenil ester L-glutamina

Nt Boc L-prolina

Nt Boc-s-acetamidometil L-cisteína

Nt Boc L-glicina

Para activar el grupo carbonil se usó 0.54 mmol de DCC y 0.54 mmol de HOBT

Para separar el péptido de la resina se usó la técnica con condiciones “suaves” de acidez, para lo cual se usaron 5ml de TFA concentrado en lugar de los 8 ml que se usaron en las condiciones “fuertes” de acidez, siguiendo la técnica ya descrita. Con las condiciones de desprotección no se eliminó el grupo acetamidometil de la cisteína. Para eliminar este grupo se usó la mitad del péptido obtenido. Se disolvieron 365 mg del péptido en solución de metanol:agua (1:6), en un matraz Erlenmeyer de 500 ml se puso en el agitador magnético y se agregó gota a gota una solución de yodo (10 mg de yodo sublimado en 40 ml de metanol), se dejó en agitación durante 2 horas, después se neutralizó con 5 gotas de una solución de bisulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 25% en agua). Se evaporó el metanol en el rotovapor a 40°C y después se pasó por la columna de Sephadex G-25 (2.5 x 16 cm) para eliminar las sales y enseguida se liofilizó el péptido.

#### **Péptido PV-4**

La secuencia de este péptido es: CSDEALPLGSPRCDLK (aa 52-67) y se localiza en la región amino terminal. Se empezó con 1 g de la resina: Nt Boc-Nε-(2 Cloro-CBZ)-L-lisina PAM, que tiene 0.28 mmol/g de lisina. Se emplearon 0.56 mmol de cada aminoácido. Los aminoácidos empleados son los siguientes:

Nt Boc L-leucina

Nt Boc L-ácido aspártico β-bencil ester

Nt Boc-s-acetamidometil L-cisteína

Nt Boc Nw-mesitilen sulfonil L-arginina

Nt Boc L-prolina

Nt Boc (o-bencil) L-serina

Nt Boc L-glicina

Nt Boc L-alanina

Nt Boc L-ácido glutámico γ-bencil ester

Para activar el grupo carbonil se usó 0.56 mmol de DCC y 0.56 mmol de HOBT

Antes de separar el péptido de la resina se formó un enlace disulfuro entre los grupos -SH de las dos cisteínas, lo que se logra al mismo tiempo que se desprotege el grupo acetamidometil. Esta reacción se llevó a cabo con yodo. Se agregó a la resina 500 mg de yodo en 20 ml de ácido acético (1:5 en agua) dejando en agitación durante 2 horas, después se lavó 5 veces con DCM, isopropanol, DCM, etanol absoluto, y DCM. Después se secó al vacío y enseguida se separó el péptido de la resina. En este péptido se usó arginina protegida con el grupo mesitilen y solo se necesitó de condiciones "suaves" de acidez para separarlo siguiendo los mismos pasos que para el péptido PV-3.

## MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se estudiaron 30 pacientes con el diagnóstico de púrpura trombocitopénica autoinmune crónica de la consulta de la Clínica de Púrpuras, y 99 donadores de sangre seleccionados al azar como controles negativos del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional S-XXI, IMSS.

El criterio de inclusión fue que los pacientes deberían tener el diagnóstico de PTA crónica, es decir con más de 6 meses de evolución, no importando el sexo ni la edad. De esta forma se estudiaron 23 mujeres de las cuales 4 eran niñas y 19 adultas y 7 hombres de los cuales 2 eran niños y 5 adultos.

En los pacientes con PTA crónica y en el grupo control negativo se tomó una muestra de sangre venosa de 10 ml que se colectó en un tubo con 4 gotas de ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA) al 10% como anticoagulante. Se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos para obtener plasma rico en plaquetas y después se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos para obtener plasma pobre en plaquetas (este plasma se guardó en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) y el botón de plaquetas se lavó por 3 veces con un amortiguador de PBS-EDTA-Alb pH=7. Después a este botón plaquetario se le agregó una mezcla de tricloroetileno/cloroformo 1:1 (V:V), incubando 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  para disolver la membrana plaquetaria. Después se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se guardó en 2 alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La mezcla del tricloroetileno/cloroformo disuelve los lípidos de la membrana plaquetaria dejando en el sobrenadante proteínas plaquetarias y anticuerpos unidos a la membrana de las plaquetas. A este sobrenadante se le llama eluido.

También se obtuvieron sueros de personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana en diferentes estadios clínicos del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica y Diagnóstico (INDRE), Consejo Nacional de Prevención y Control del SIDA (CONASIDA) y el Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional La Raza. IMSS. El CONASIDA y el Hospital de Infectología; además de los sueros proporcionaron información clínica de los pacientes, como el estadio de la enfermedad,

tratamiento recibido, forma de contagio y parámetros de laboratorio (niveles en sangre de plaquetas y linfocitos T CD4)

### **ENSAYO INMUNOENZIMATICO (TECNICA DE ELISA)**

Debido a que no se conoce el comportamiento químico de los péptidos sintetizados y con el objetivo de estandarizar la técnica de ELISA se probaron diferentes concentraciones de los péptidos (5, 10, 20 y 40  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ), diferentes temperaturas para la sensibilización de las placas con el antígeno (4, 22 y 37 °C), diferentes tiempos de sensibilización (1 hora, 12 horas), diferentes marca de placas (Costar y Nunc), diferentes diluciones del plasma (1:50 y 1:100), diferentes diluciones del eluido (sin diluir, 1:10 y 1:25), diferentes diluciones del segundo anticuerpo (1:1000 y 1:2000). Finalmente se seleccionaron las condiciones siguientes:

#### **a) sensibilización**

Cada pozo de la placa (Nunc, Roskilde, Denmark) se sensibilizó con 100  $\mu\text{l}$  de una concentración de los péptidos de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en buffer de carbonatos pH= 9.8 a 37°C durante 60 minutos.

#### **b) primer anticuerpo**

En cada pozo se colocó 100  $\mu\text{l}$  de plasma diluido 1:100 ó 100  $\mu\text{l}$  del eluido, diluido 1:25 en amortiguador PBS-tween 20 (0.3%)-Alb(1%) pH= 7.4 a 37°C durante 60 minutos.

#### **c) segundo anticuerpo**

En cada pozo se colocaron 100  $\mu\text{l}$  de globulina anti IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina diluida 1:2000 en amortiguador PBS-tween (0.3%)-Alb(1%) a 37 °C durante 60 minutos.

#### **d) sustrato**

En cada pozo se colocaron 100  $\mu\text{l}$  de p-nitrofenilfosfato (2 tabletas en 10 ml de amortiguador de dietanolamina pH= 9.8 a 37 °C durante 30 minutos.

La reacción se detuvo con 50  $\mu\text{l}$  por pozo de NaOH 2N.

Se realizó la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm

## **TECNICA DE ELISA CON COMPETENCIA**

Para el ensayo de competencia se utilizó la técnica descrita anteriormente, pero los sueros se incubaron previamente (a 37°C durante 30 minutos) con el péptido en solución ( $10^{-5}$  M).

## **CURVAS DE INHIBICION EN TECNICA DE ELISA**

Con el objetivo de conocer la concentración en la cual un péptido es capaz de inhibir la reacción del péptido unido a la placa se realizó un estudio a través de curvas de inhibición utilizando la técnica de ELISA con competencia, pero se trabajó con un rango más amplio de concentraciones del péptido.

## **PREPARACION DE ANTICUERPOS ANTI-PV-1 HIPERINMUNES EN CONEJO**

Se inmunizaron dos conejas (Nueva Zelanda) de alrededor de 2.5 K de peso. El esquema de inmunización fue con 1 mg de péptido disuelto en 1 ml de amortiguador de fosfatos (PBS) pH=7.4, emulsionado con 1 ml de adyuvante completo de Freund para la primera inmunización y 1 ml de adyuvante incompleto para las siguientes. Se distribuyó la dosis en 3 inyecciones subcutáneas, en el dorso de las conejas. Las inmunizaciones se realizaron cada 2 semanas, obteniéndose una muestra de sangre venosa antes de cada inmunización.

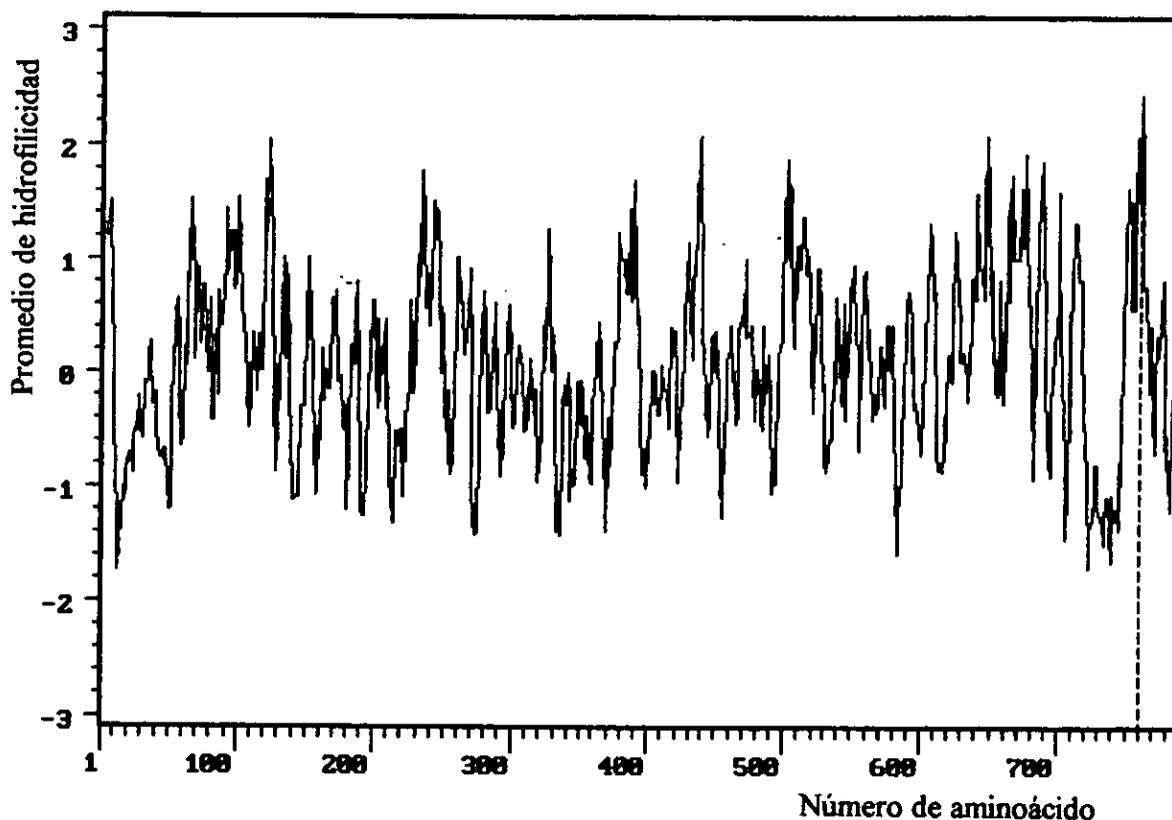
## **WESTERN BLOT DEL SUERO ANTI-PV-1**

Con el objetivo de ver si los anticuerpos hiperinmunes anti-PV-1 de conejo, son capaces de reconocer un epitopo en las proteínas del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) se realizó la técnica de "western blot". Las tiras de nitrocelulosa contienen proteínas del virus que se hicieron reaccionar con los sueros preinmune e hiperinmune anti-PV-1 de conejo, siguiendo las instrucciones del fabricante (Organon Teknika). Como segundo anticuerpo se empleó una globulina anti-IgG de conejo conjugada con fosfatasa alcalina.

## RESULTADOS

Como el objetivo de esta tesis era encontrar los epitopos de gp IIIa involucrados en la púrpura trombocitopénica autoinmune lo primero que se hizo fue predecir los determinantes antigénicos con el método de Hopp y Woods que toma en cuenta el perfil de hidrofiliidad de la secuencia de aminoácidos de la proteína, tomando una ventana de 6 aminoácidos (Hopp T.P. *et al* 1981; Hopp T.P. 1993).

La figura 1 muestra el perfil de hidrofiliidad de gp IIIa. Se observa que los picos más altos de la gráfica corresponden a los puntos de mayor hidrofiliidad de la molécula (determinantes antigénicos o epitopos).



**Figura 1.** Gráfica del perfil hidrofílico de gpIIIa usando una ventana de 6 aminoácidos. En el eje de las abscisas se grafica el número de aminoácido de la secuencia y en el eje de las ordenadas se grafica el promedio de hidrofiliidad asignado a cada aminoácido (unidades arbitrarias)

De acuerdo al perfil hidrofílico (Ph), los puntos de mayor hidrofili­cidad, se predican como los sitios más antigénicos (tabla I).

Ph= 2.42 Del aminoácido 757 al 762: EEERAR

Ph= 2.08 Del aminoácido 434 al 439: QEKEKS

Ph= 2.08 Del aminoácido 644 al 649: KKFDRE

*Tabla I. Predicción de determinantes antigénicos de la gpIIIa calculado con el método de Hopp y Woods. Ph es el promedio de hidrofili­cidad del grupo de aminoácidos y estos son los tres puntos con mayor Ph.*

La región más hidrofílica (Ph = 2.42) corresponde a los aminoácidos 757-762 (EEERAR) del dominio intracitoplasmático. Se incluyeron otros aminoácidos de la región amino y carboxilo terminal para tener el péptido PV-1 (DRKEFAKFEEERARA 748-763). La segunda y tercera regiones tienen la misma hidrofili­cidad (Ph = 2.08) y corresponden a los aminoácidos 644-649 (KKFDRE) y 434-439 (QEKEKS). El péptido PV-2 está formado por los aminoácidos KKFDRE más otros de la región carboxilo terminal para dar la secuencia KKFDREPYMTENTC (644-657). El péptido PV-3 está formado con los aminoácidos QEKEKS más otros de los extremos amino y carboxilo terminal, para dar la secuencia GCPQEKEKSFTIKP (431-444). Finalmente, como ya se mencionó en la sección de material y métodos, se incluyó un péptido que contiene el antígeno HPA-1. Siguiendo la nomenclatura propuesta para los otros péptidos se le llamó PV-4 y tiene la secuencia CSDEALPLGSPRCDLK (52-67).

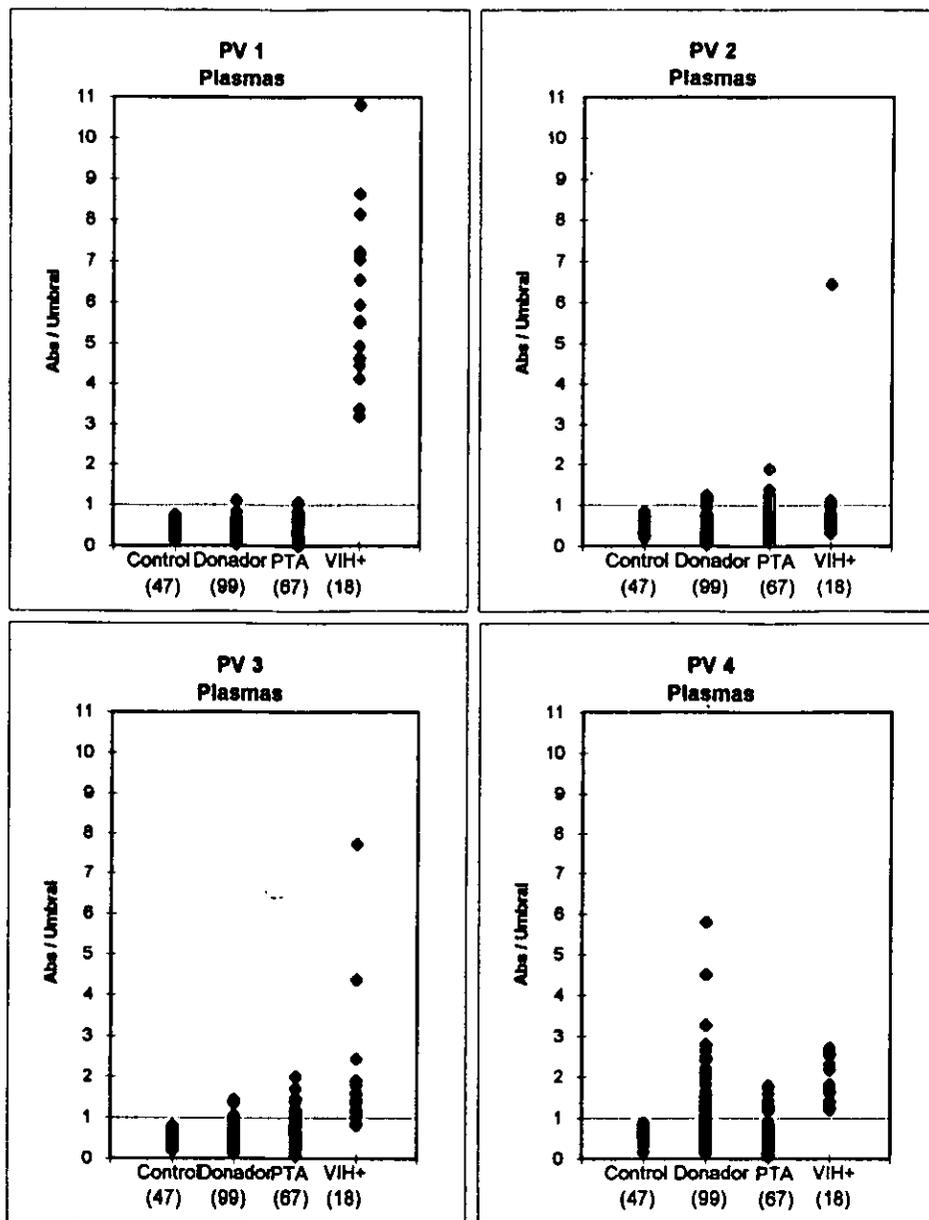


Se decidió que los péptidos deberían tener un tamaño de entre 14 y 15 aminoácidos porque los péptidos de este peso molecular se adhieren bien a las placas de poliestireno para el ensayo de ELISA, sin tener que acoplarlas a alguna proteína acarreadora (Gevorkian G. *et al.*, 1996). Una vez sintetizados los péptidos se confirmó la secuencia con un secuenciador de proteínas (Applied Biosystems, Foster City, Ca.).

Mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) se buscaron en el plasma de los pacientes con diagnóstico de púrpura trombocitopénica autoinmune anticuerpos contra estos péptidos. En la figura 2 se muestra los resultados de 67 plasmas (de 30 pacientes) probados contra los 4 péptidos. El umbral o valor de corte del ensayo se calculó sumando el valor medio de la absorbancia (405 nm) de los plasmas control más tres desviaciones estándar ( $X + 3S$ ). Además de estos controles negativos se incluyó 99 plasmas de donadores de sangre seleccionados al azar.

Accidentalmente se incluyó un plasma de una persona VIH positiva. Este plasma dio un resultado fuertemente positivo con el péptido PV-1 y negativo para los otros 3 péptidos. Por tal motivo se probaron 18 sueros de personas VIH+ del banco de sueros proporcionados por el INDRE. En la figura 2 se incluye el resultado de estos 18 sueros VIH+. En esta figura se puede observar claramente que los pacientes VIH+ tienen anticuerpos que reaccionan muy bien con el péptido PV-1 y en menor grado con PV-3 y PV-4. Estos resultados dieron base para investigar si los anticuerpos dirigidos contra éste epitopo tiene algún papel en la trombocitopenia que se presenta en los sujetos infectados con el VIH-1.

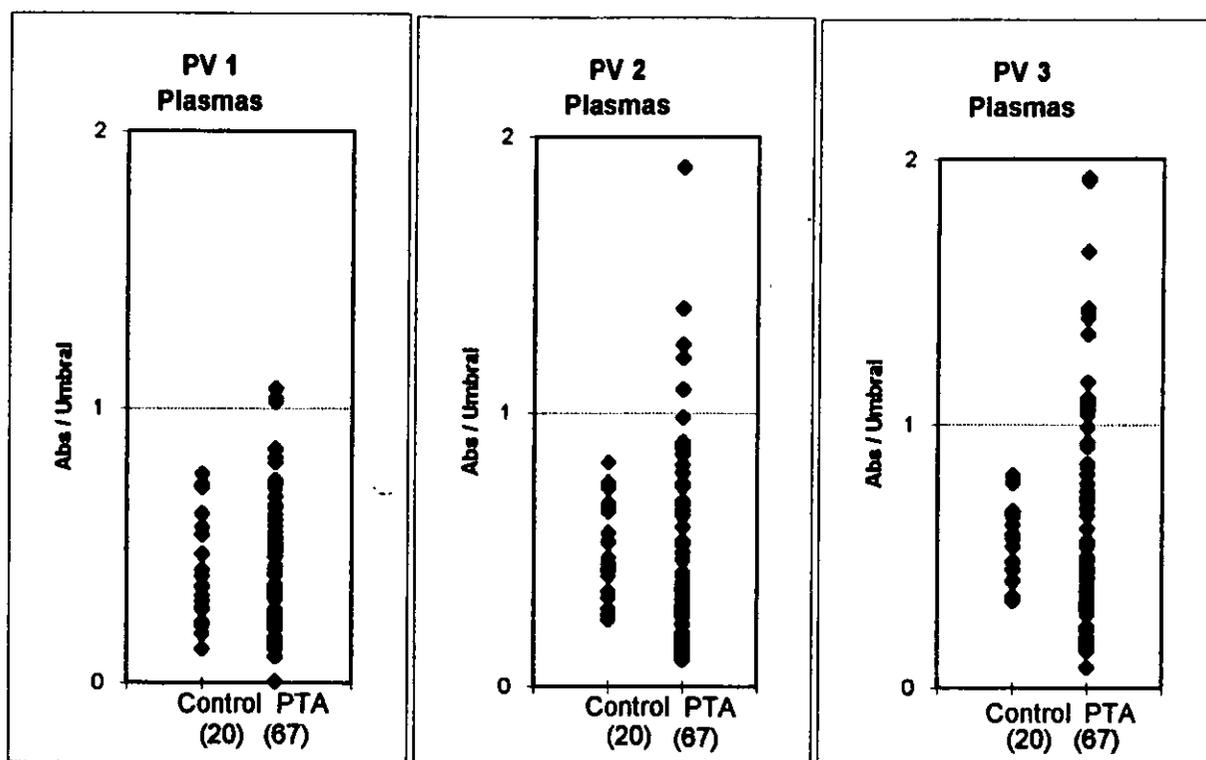
En la misma figura 2, puede observarse que 24 de los 99 plasmas de donadores reaccionaron con el péptido PV-4; no así con los péptidos PV-1, PV-2 y PV-3. Por tal motivo PV-4 se excluyó de los resultados posteriores. No se estudió ulteriormente las posibles causas de la presencia de anticuerpos anti-PV-4 en donadores de sangre. Sería interesante continuar este estudio, ya que como se mencionó en la introducción, PLA-1 es un antígeno que está involucrado en trombocitopenia autoinmune.



**Figura 2. Reactividad de anticuerpos en pacientes con púrpura trombocitopénica autoinmune y pacientes VIH positivos contra 4 péptidos de la gpIIIa en ELISA.**

*En el eje de las abscisas aparecen los grupos estudiados: control negativo (Control), donadores de sangre (Donador), pacientes con púrpura trombocitopénica autoinmune (PTA) y personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En el eje de las ordenadas se grafica el valor de la razón de la absorbancia (405 nm) de los plasmas problema entre el umbral del ensayo.*

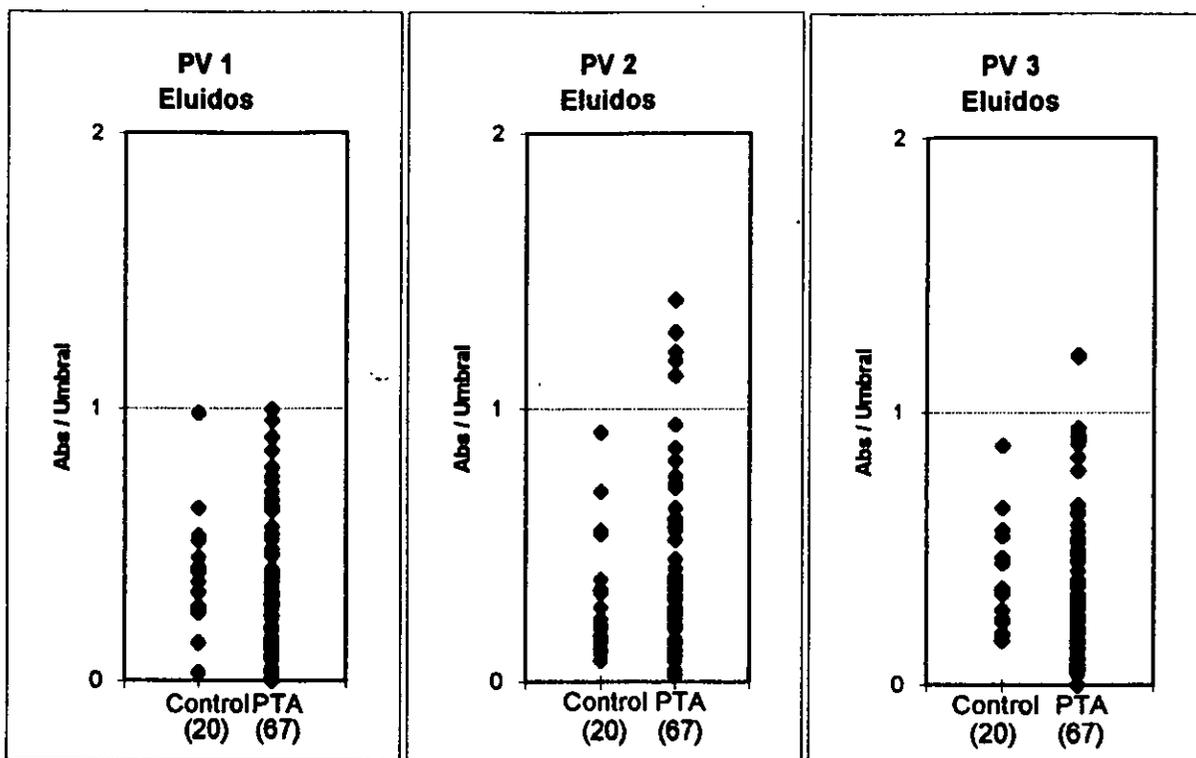
En la figura 3 se muestra únicamente los resultados de los plasmas de los pacientes con PTA y los plasmas control. En las ordenadas se grafica la razón de la absorbancia (405 nm) de cada uno de los plasmas problema entre el umbral de corte, con el objetivo de poner los resultados de todos los péptidos en la misma escala. Estos resultados indican que los péptidos PV-2 y PV-3 son los más reconocidos por los anticuerpos de algunos de los pacientes con PTA.



**Figura 3. Reactividad de los anticuerpos en el plasma de pacientes con PTA contra tres péptidos de la gpIIIa.**

*En el eje de las abscisas aparecen los grupos estudiados: plasmas control (Control) y plasmas de pacientes con PTA (PTA). En el eje de las ordenadas se grafica la razón de la absorbancia (405 nm) de cada uno de los plasmas problema entre el umbral del ensayo.*

También mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) se buscó en los eluidos de las plaquetas de pacientes con diagnóstico de púrpura trombocitopénica autoinmune anticuerpos contra estos péptidos. En la figura 4 se muestran los resultados de 67 eluidos (de 30 pacientes) y 20 eluidos control contra los 3 péptidos. En general, estos eluidos reaccionaron poco contra los péptidos PV-1, PV-2 y PV-3. Para confirmar si la técnica de preparación del eluido era la adecuada se practicó otro ensayo inmunoenzimático sensibilizando la placa con los eluidos y agregando luego inmunoglobulina IgG anti-humana conjugada con peroxidasa. Este ensayo confirmó que efectivamente los eluidos contenían anticuerpos (datos no mostrados).



**Figura 4. Reactividad de los anticuerpos en el eluido de la membrana plaquetaria de pacientes con PTA contra tres péptidos de la gpIIb/IIIa.**

*En el eje de las abscisas aparecen los grupos estudiados: eluidos control (Control) y eluidos de personas con PTA (PTA). En el eje de las ordenadas se grafica la razón de la absorbancia (405 nm) de cada uno de los eluidos problema entre el umbral del ensayo.*

El estudio se realizó en 30 pacientes con púrpura trombocitopénica autoinmune crónica, 23 mujeres: 4 niñas y 19 adultas; y 7 varones: 2 niños y 5 adultos. Los resultados se muestran en la tabla 2 donde se observa que el 3.3% (1/30) tuvieron anticuerpos contra PV-1, 10% (3/30) contra PV-2 y 20% (6/30) contra PV-3. Otro aspecto que puede ser observado es que 23.3% (7/30) tuvieron anticuerpos contra alguno de los 3 péptidos y que el 13.3% (4/30) reaccionaron contra un solo péptido mientras que el 10% (3/30) presentaron anticuerpos contra 2 péptidos (tabla II).

Paciente	Número de muestras	tx	Sexo	Edad	PV1	PV2	PV3
1	1	opso	F				
2	1	opso	F				
3	2	pdn	F	11		2/2 pos	
4	2	opso	F				
5	2	pdn/opso	F	33			
6	7	pdn/opso	F	52	3/7 pos		2/7 pos
7	2	pdn	F	44			
8	2	pdn/opso	F	27			
9	1	pdn/opso	F				
10	1	nada	F	18			
11	1	pdn	F	63			1/1 pos
12	4	pdn/opso	F			1/4 pos	3/4 pos
13	1	nada	F	21			
14	1		F				
15	1	nada	F	65			
16	1	pdn	F	6			
17	6	opso	F	39			1/6 pos
18	1	pdn	F	70			
19	4	pdn/opso	F	75			
20	2	nada	F				
21	1	pdn	F	40			
22	5	pdn/opso	F	36		3/5 pos	4/5 pos
23	1	pdn	F	5			
24	1	opso	M				
25	1	pdn	M	4			1/1 pos
26	2	pdn/opso	M	15			
27	4	opso	M	9			
28	1	pdn/opso	M	6			
29	1	pdn	M	48			
30	3	pdn/opso	M	74			

**Tabla II. Relación de pacientes con PTA y el resultado obtenido con 3 péptidos de gpIIb.**

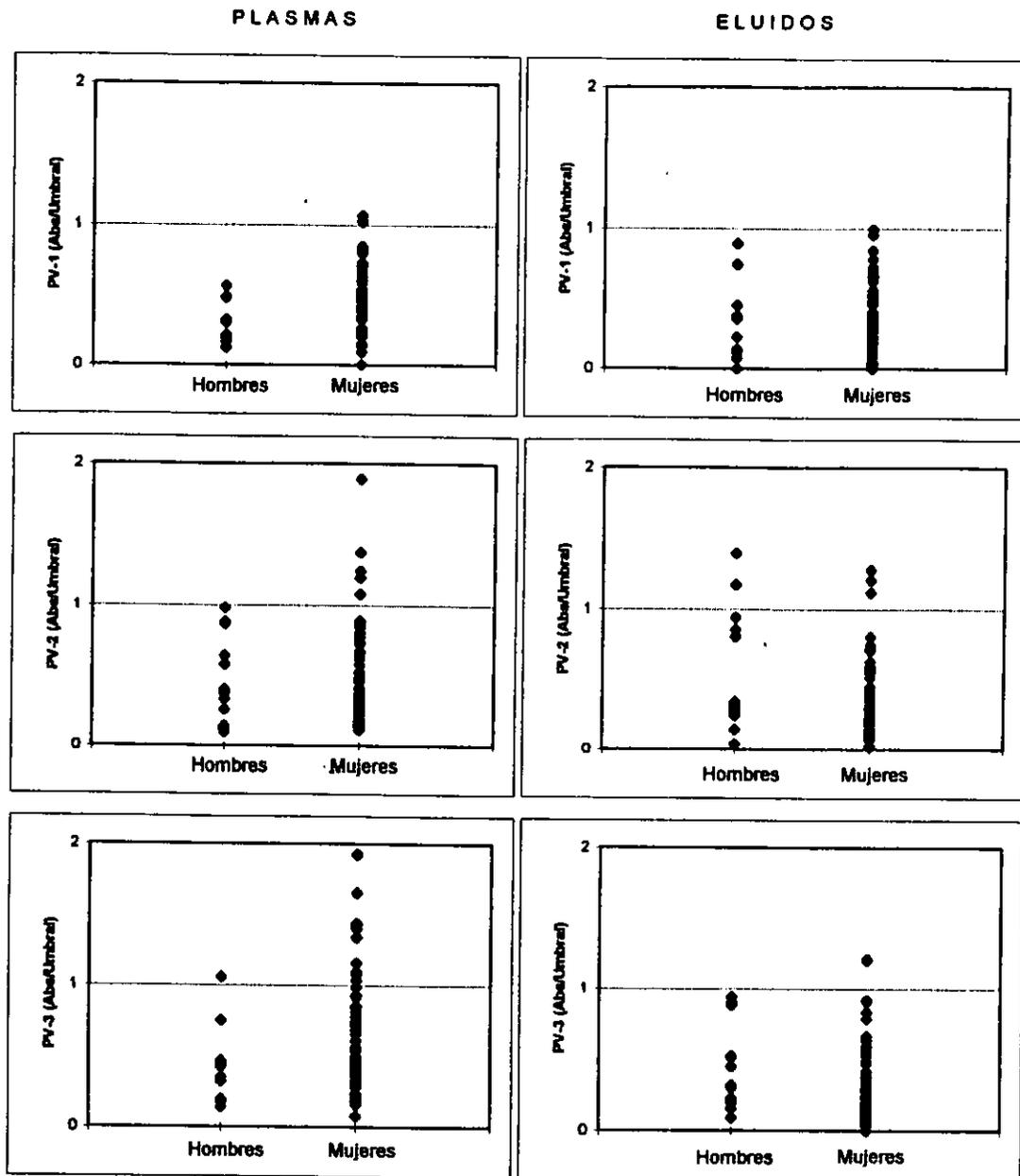
**Tx = tratamiento que estaban recibiendo, opso = eritrocitos opsonizados con IgG anti-D, pdn = prednisona y nada = en este momento estaban sin tratamiento porque se encontraban en remisión.**

Cuando se hace el gráfico de acuerdo con el sexo de los pacientes pareciera que las mujeres tienen anticuerpos en contra de los péptidos y los hombres no. En realidad esta apreciación es debida al sesgo de la muestra, ya que se estudiaron muy pocos hombres (figura 5). Este sesgo concuerda con lo reportado en la literatura, de que la PTA crónica es más frecuente en el sexo femenino.

En relación con la edad no se observa preferencia en la reactividad contra los péptidos (figura 6). Es decir la PTA crónica aunque es más frecuente en los adultos, cuando se presenta en los niños, no es diferente a aquella de los adultos.

De los 30 pacientes con PTA crónica estudiados 25 presentaban púrpura activa, por lo tanto estaban recibiendo algún tratamiento: 6 con eritrocitos opsonizados, 9 con prednisona, 10 con eritrocitos opsonizados más prednisona; 4 no recibían ningún tratamiento por encontrarse en remisión y en un paciente no se pudo saber si estaba en tratamiento o no (tabla II). En la figura 7 puede observarse que 7 de los 25 pacientes con púrpura activa tuvieron efectivamente anticuerpos contra alguno de los péptidos a pesar del tratamiento, mientras que en los pacientes que se encontraban en remisión no se encontraron anticuerpos.

No se encontró una correlación estadística entre la cifra de plaquetas y la presencia de anticuerpos anti-péptido (figura 8), sin embargo, la presencia de estos anticuerpos ocurrió únicamente en aquellos pacientes con púrpura activa que tuvieron cifras de plaquetas por debajo de  $100 \times 10^9$  plaquetas/L. Tal vez estos anticuerpos pudieran ser los causantes de la trombocitopenia.

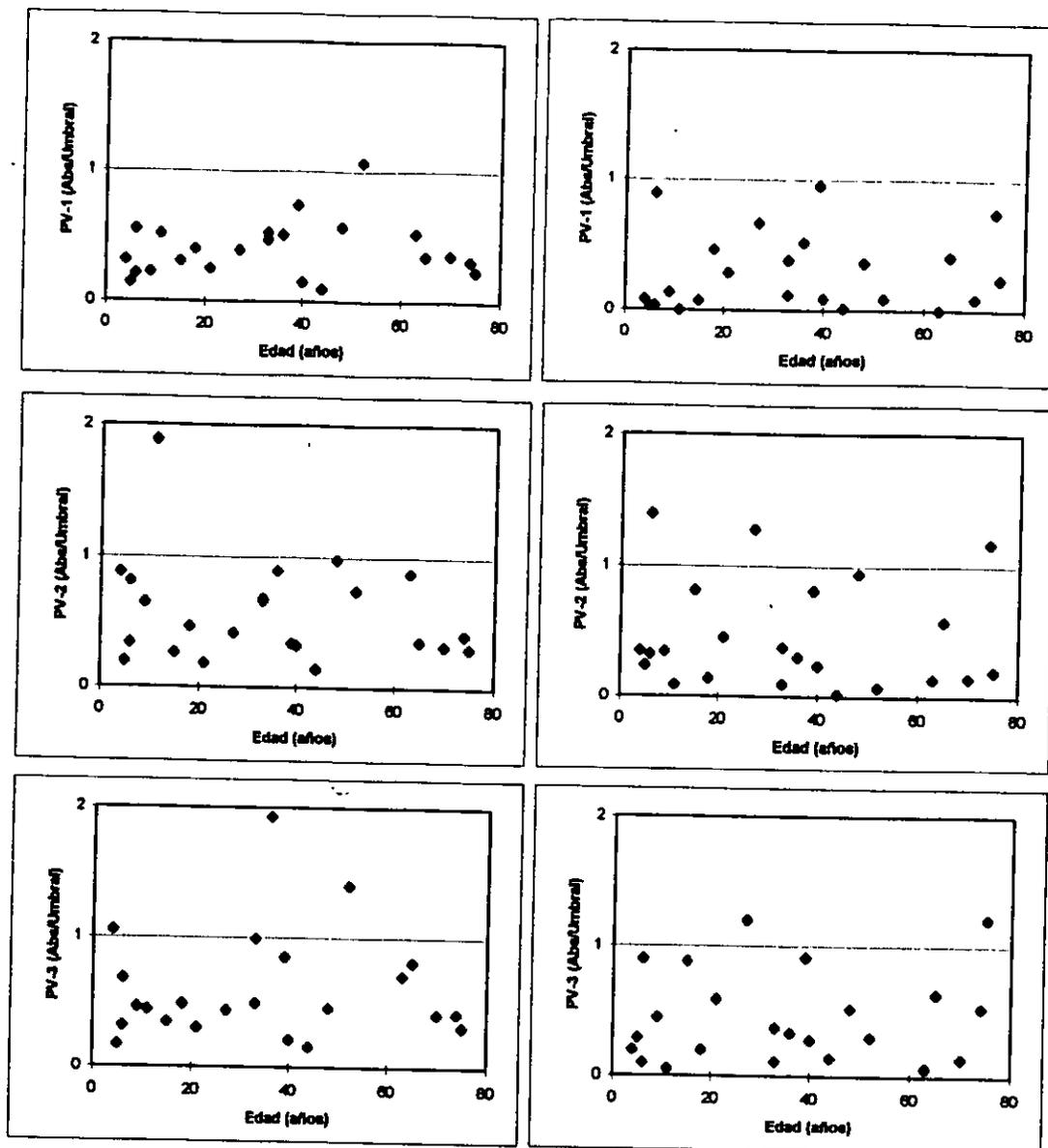


**Figura 5. Reactividad de anticuerpos en el plasma de pacientes con PTA con 3 péptidos de gpIIIa: diferencias entre sexos.**

En el eje de las abscisas se presentan las categorías masculino y femenino resultados de los sexos masculino y femenino y en el eje de las ordenadas se grafica la razón de la absorbancia (405 nm) de cada uno de los plasmas (o eluidos) problema entre el umbral del ensayo.

PLASMAS

ELUIDOS

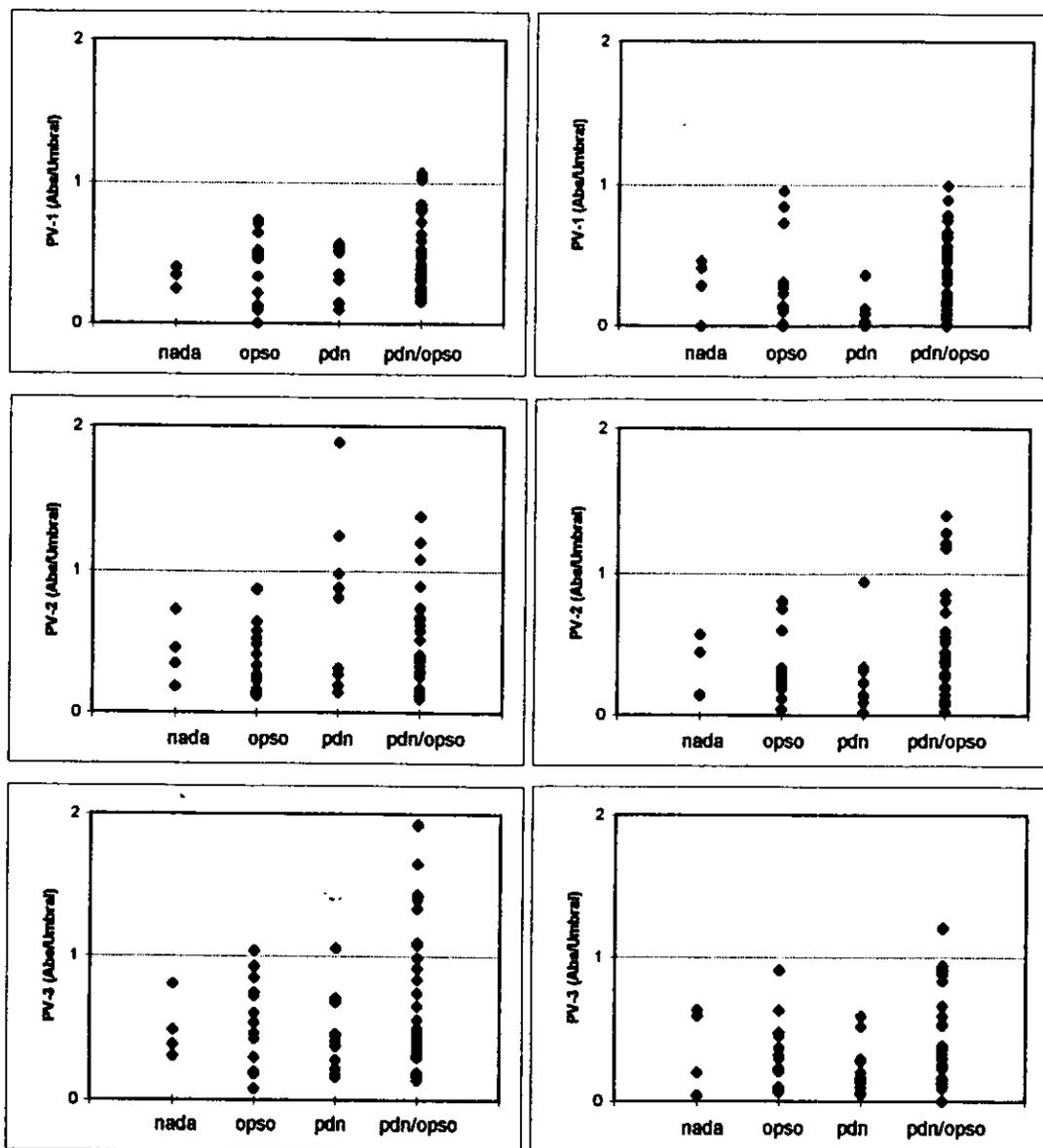


*Figura 6. Reactividad de anticuerpos en el plasma de pacientes con PTA con 3 péptidos de gpIIIa: diferencias por edad.*

*En el eje de las abscisas se grafica la edad la edad de los pacientes en años y en el eje de las ordenadas se grafica la razón de la absorbancia (405 nm) de cada uno de los plasmas (o eluidos) problema entre el umbral del ensayo.*

PLASMAS

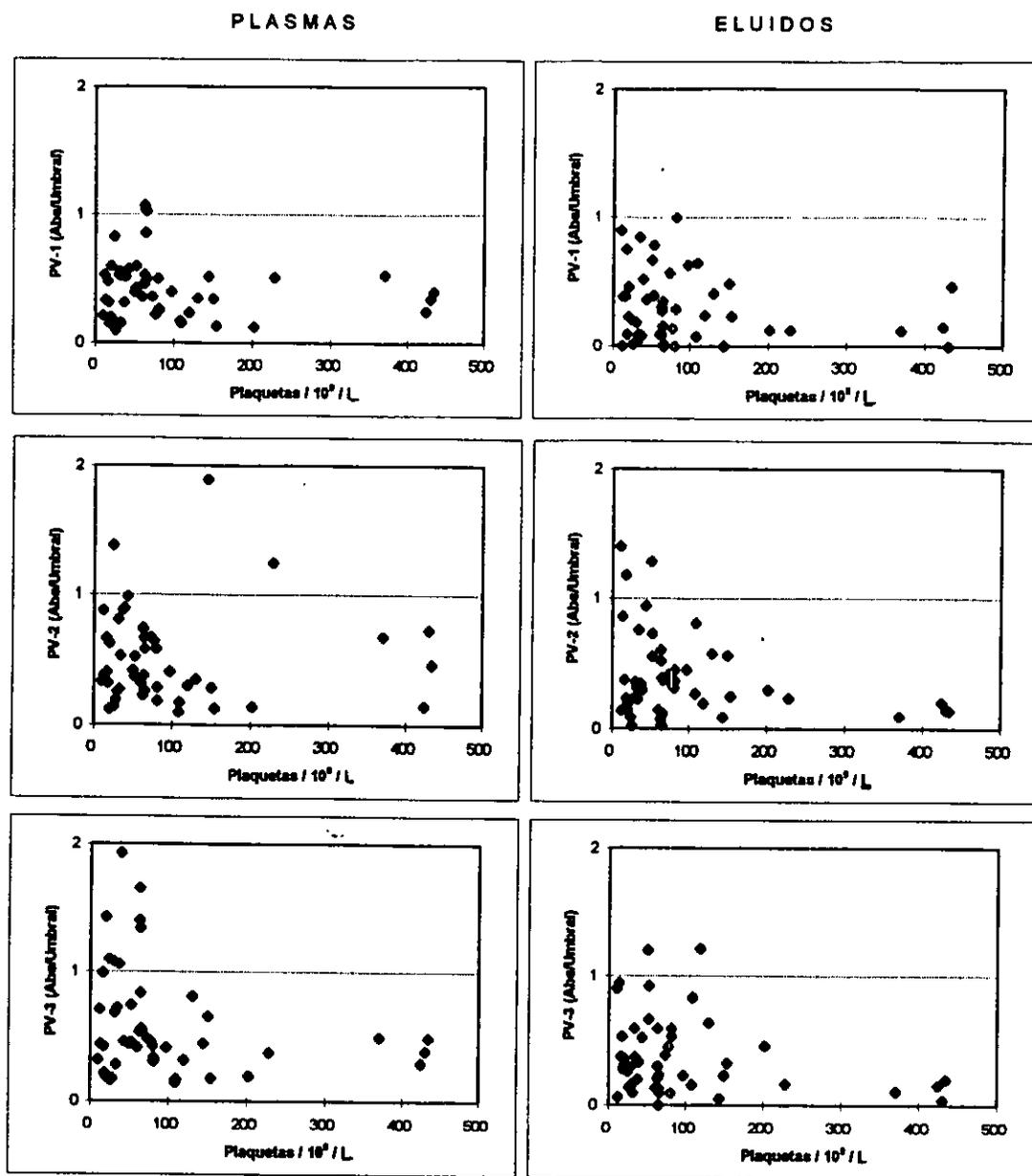
ELUIDOS



**Figura 7. Reactividad de anticuerpos en el plasma de pacientes con PTA con 3 péptidos de gpIIIa: diferencias por el tratamiento.**

*En el eje de las abscisas se presentan los diferentes tratamientos que estaban recibiendo los pacientes: sin tratamiento (nada), con eritrocitos opsonizados con IgG anti-D (opso), con prednisona (pdn) y la combinación de prednisona con eritrocitos opsonizados (pdn/opso).*

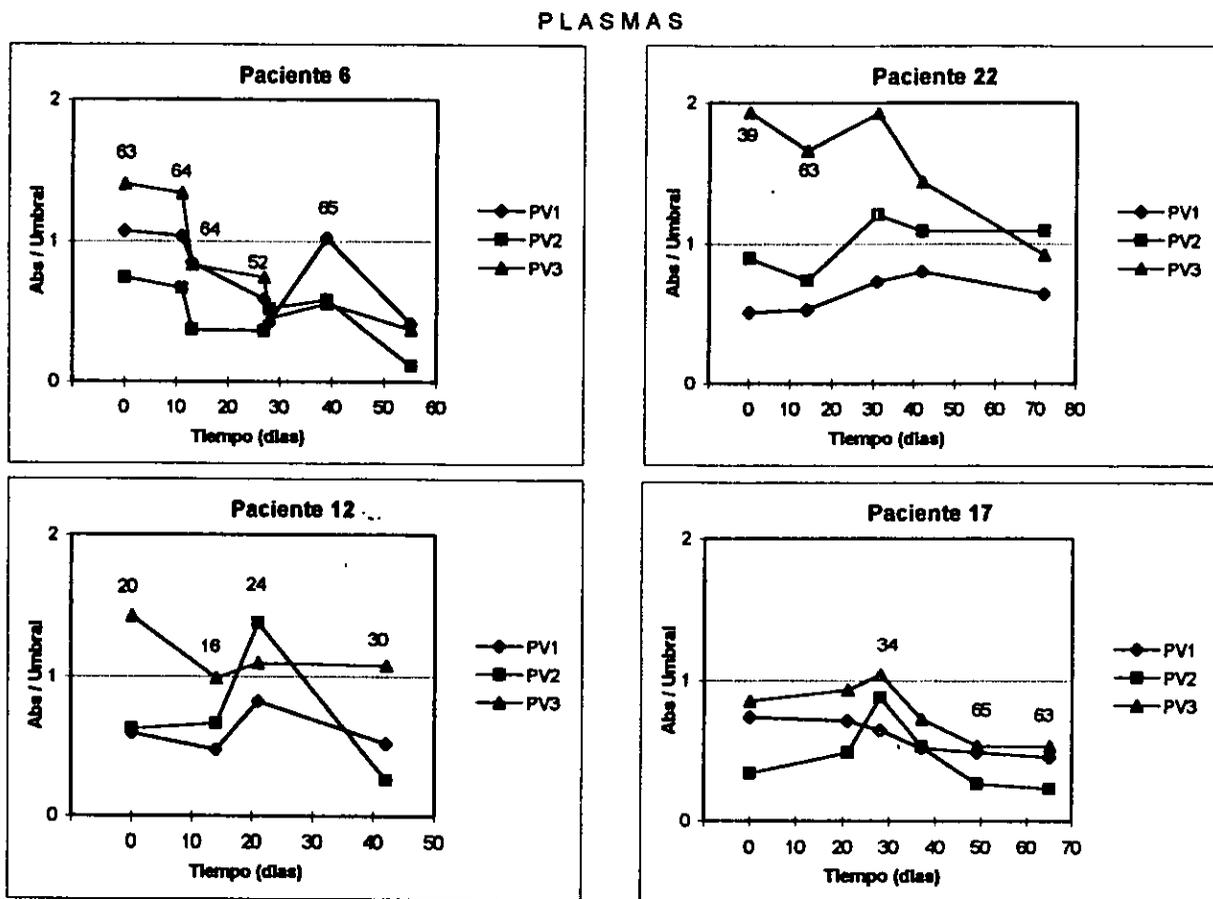
*En el eje de las ordenadas se grafica la razón de la absorbancia (405 nm) de cada uno de los plasmas (o eluidos) problema entre el umbral del ensayo.*



**Figura 8. Reactividad de anticuerpos en el plasma de pacientes con PTA con 3 péptidos de gpIIIa: correlación con el número de plaquetas.**

*En el eje de las abscisas se grafica el número de plaquetas  $\times 10^9 / L$  y en el eje de las ordenadas se grafica la razón de la absorbancia (405 nm) de cada uno de los plasmas (o eluidos) entre el umbral del ensayo.*

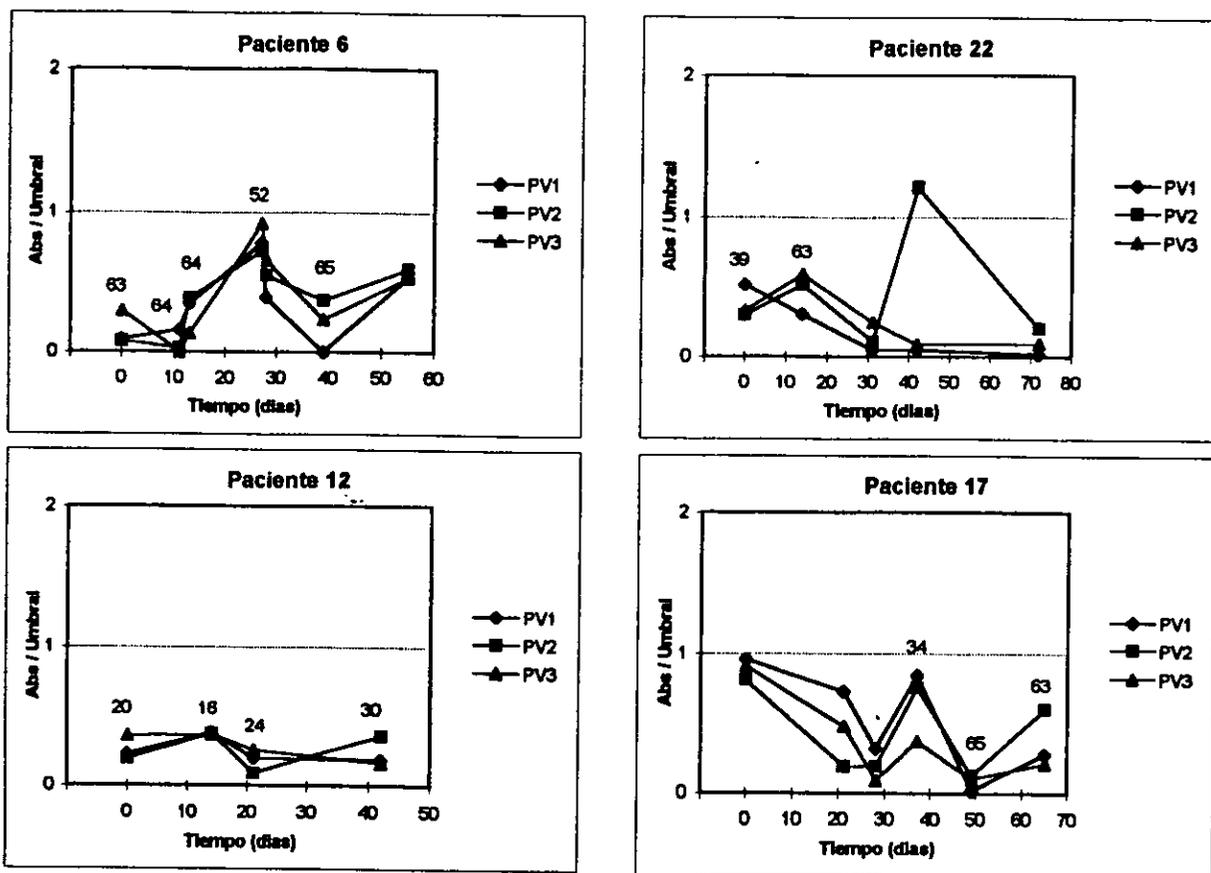
A los pacientes que tenían púrpura activa se les tomó muestra de sangre en diferentes fechas, para investigar si había cambios en la presencia de los anticuerpos en el transcurso de la enfermedad. Se puede observar que hay fluctuaciones en el tiempo en cuanto a la presencia de anticuerpos en el plasma (figura 9) y en el eluido de la membrana plaquetaria (figura 10).



**Figura 9. Reactividad de anticuerpos en el plasma de pacientes con PTA con 3 péptidos de la gpIIb: heterogeneidad entre pacientes y variaciones en el tiempo.**

En el eje de las abscisas se grafica el tiempo transcurrido entre las muestras analizadas. El tiempo cero corresponde a la primer muestra de plasma estudiado. En el eje de las ordenadas se grafica la razón de la absorbancia (405 nm) entre el umbral del ensayo.

## ELUIDOS



**Figura 10. Reactividad de anticuerpos en el eluido de pacientes con PTA con 3 péptidos de la gpIIIa: heterogeneidad entre pacientes y variaciones en el tiempo.**

*En el eje de las abscisas se grafica el tiempo transcurrido entre las muestras analizadas. El tiempo cero corresponde a la primer muestra de eluido estudiado. En el eje de las ordenadas se grafica la razón de la absorbancia (405 nm) entre el umbral del ensayo.*

## RESULTADOS DE LA INVESTIGACION DE ANTICUERPOS ANTI-PV-1 EN PACIENTES INFECTADOS CON EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

Las personas infectadas con el VIH-1 tienen en su suero anticuerpos contra diferentes epitopos de las glicoproteínas virales. El inmuno-diagnóstico de esta infección se basa en la presencia de estos anticuerpos.

Se ha reportado varios ejemplos de mimetismo molecular entre proteínas del VIH-1 y proteínas humanas; todos ellos juegan algún papel en la patogénesis del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) por reacciones cruzadas de los anticuerpos anti-proteínas virales con las proteínas del organismo. Por ejemplo, la homología entre una secuencia muy conservada de la región carboxi terminal de la proteína transmembranal gp41 (aa 837-844) y la región amino terminal de la cadena  $\beta$  de la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (HLA clase II) está relacionada con la disfunción inmune de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Golding H. *et al.*, 1989). La homología entre otra región de gp41 y una región de interleucina 2 (IL-2) posiblemente sea la causa de la actividad inmunosupresora del VIH-1 (Reiher III W.E. *et al.*, 1986). La homología entre una región (aa 245-289) de la glicoproteína de la membrana gp120 y neuroleucina está relacionada con el complejo de demencia del SIDA (Lee M.R. *et al.*, 1987). Las reacciones cruzadas de anticuerpos anti-gp41 con astrocitos humanos (Yamada M. *et al.*, 1991; Eddleston M. *et al.*, 1993) y el mimetismo molecular entre la región V3 de gp120 y proteínas del cerebro humano (Trujillo J.R., *et al.* 1993) pueden causar las complicaciones del sistema nervioso encontradas en los pacientes con SIDA. También se identificó una homología estructural entre gp120 y la proteína C1q del complemento dado que anticuerpos anti gp120 reaccionaron con C1q (Stoiber H. *et al.*, 1994). Además también se ha reportado homología antigénica y funcional entre gp41 y el factor H del complemento (Pinter C. *et al.*, 1995).

Un gran número de pacientes infectados con el VIH-1 tienen trombocitopenia, y en algunos la trombocitopenia llega a ser tan severa que el comportamiento clínico es el mismo que el de las personas con PTA. En algunos de estos pacientes se ha identificado anticuerpos contra las proteínas del VIH-1 que dan reacción cruzada contra diferentes proteínas

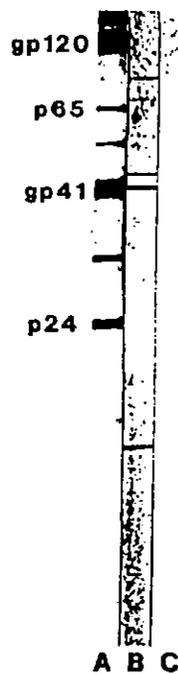
plaquetarias y en algunos de ellos los anticuerpos están cruzando con la gpIIIa (Bettaieb A. *et al.*, 1992; Bettaieb A. *et al.*, 1996).

El hecho de que los anticuerpos de personas infectadas con el VIH-1 tuvieron una gran reactividad con el péptido PV-1 (figura 2) mientras que los anticuerpos de los pacientes con PTA no la tuvieron, y de acuerdo con lo reportado en la literatura se decidió investigar el por qué de esta reactividad con la hipótesis siguiente:

**El virus de la inmunodeficiencia humana tiene proteínas con regiones de homología con el péptido PV-1 de gp IIIa. Los anticuerpos dirigidos contra la proteína del VIH dan reacción cruzada contra las proteínas plaquetarias.**

La identificación de las proteínas del VIH-1 que tienen homología con el péptido PV-1 se realizó en técnica de "Western blot", usando un suero hiperinmune anti PV-1 preparado en conejos. Las tiras de nitrocelulosa que contienen las proteínas virales previamente separadas por electroforesis se hicieron reaccionar con un suero humano VIH+ como control positivo, el suero hiperinmune anti PV-1 de conejo y el suero preinmune del conejo como control negativo (figura 11).

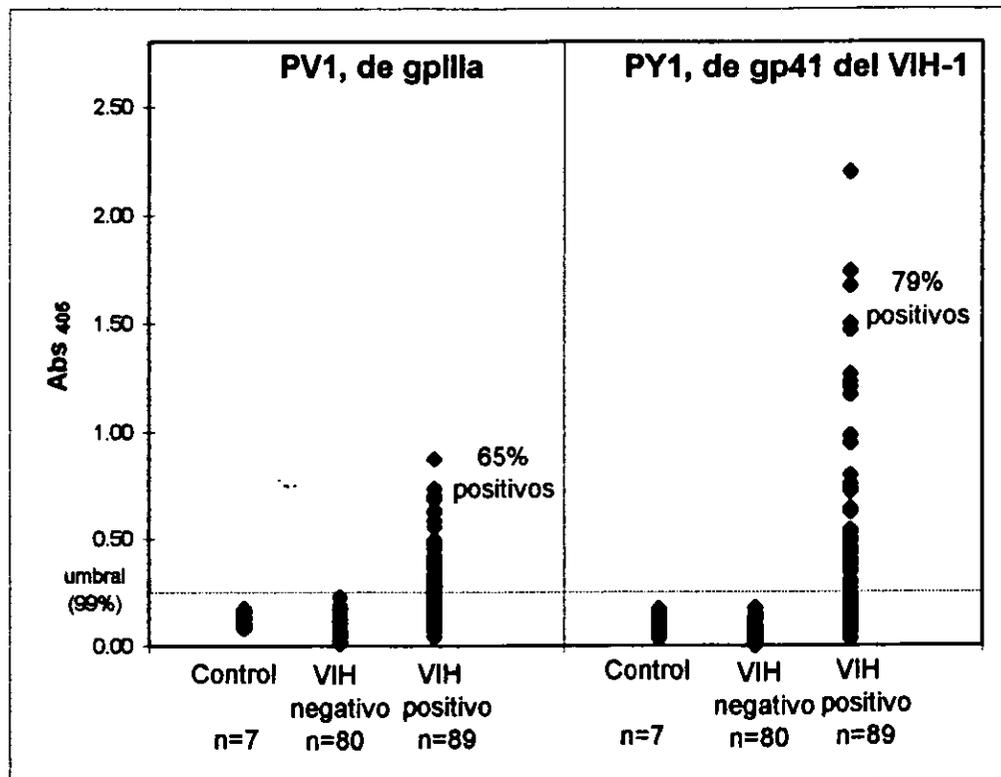
En la figura 11 se observa claramente que el suero hiperinmune anti PV-1 formó una banda muy bien definida que corresponde a la proteína de la envoltura viral gp41, es decir el anticuerpo anti PV-1 está reconociendo un epitopo en gp 41 parecido al péptido PV-1 de gpIIIa. Además de esta banda se observaron otras bandas de menor intensidad, cuyos pesos moleculares no correspondieron a los pesos moleculares de proteínas virales. Tal vez éstas otras bandas son proteínas de las células donde se cultivó el virus. (Los virus se cultivan en linfocitos humanos para obtener posteriormente las proteínas virales que son separadas por electroforesis y después transferidas a nitrocelulosa).



**Figura 11.** "Western blot" del suero hiperinmune anti PV-1 de conejo en tiras de nitrocelulosa que contienen proteínas del VIH-1. Se muestran los resultados de un suero humano VIH<sup>+</sup> como control positivo (A), suero hiperinmune anti PV-1 de conejo (B) y el suero preinmune del conejo (C)

Usando un algoritmo computacional de predicción de estructura secundaria de las proteínas (Gibrat J.F. *et al.*, 1987) se encontró que la secuencia EKNEQELLELDKW (aa 655-667) de gp41 del VIH-1 tiene homología estructural con el péptido PV-1 de gpIIIa de plaquetas humanas. De acuerdo a éste programa las dos secuencias podrían tener una estructura secundaria de hélice  $\alpha$ . No se conoce la estructura cristalográfica de gpIIIa, pero la estructura de gp41 sí es conocida y se sabe que la secuencia EKNEQELLELDKW tiene estructura de hélice  $\alpha$  (Chan D.C. *et al.*, 1997).

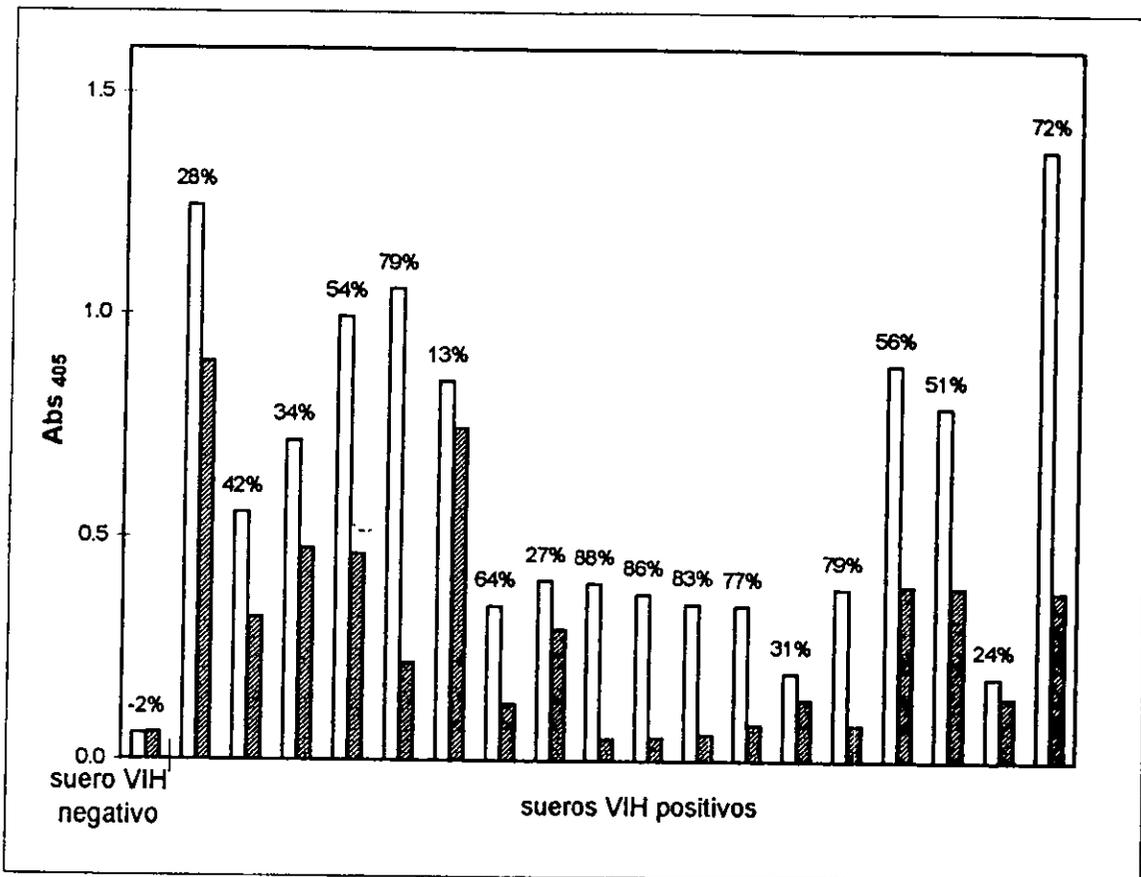
Se sintetizó el péptido EKNEQELLELDKW(A) denominándolo PY-1. Después se buscó en técnica de ELISA si los sueros de los pacientes VIH<sup>+</sup> reaccionaban con los péptidos PY-1 y PV-1. De los 89 sueros estudiados el 79% (70/89) reaccionaron con el péptido PY-1 y el 65% (58/89) reaccionaron con el péptido PV-1 (figura 12).



**Figura 12.** Reactividad de sueros VIH positivos y VIH negativos con el péptido PV-1 de gpIIIa de plaquetas humanas y el péptido PY-1 de gp41 del VIH-1.

En el eje de las abscisas se presentan los sueros probados: sueros control negativo (Control), sueros VIH negativos (VIH-) y sueros VIH positivos (VIH+). En el eje de las ordenadas se grafica la absorbancia (405 nm).

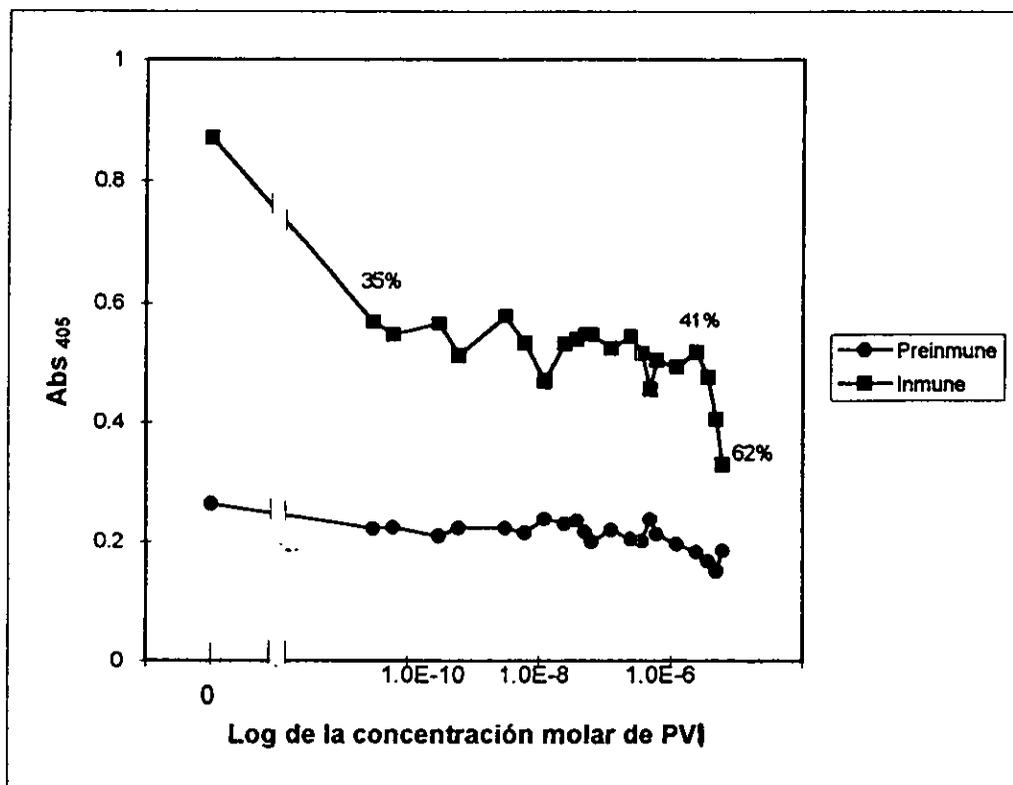
Para demostrar la especificidad serológica, así como la reactividad cruzada de los dos péptidos se realizaron ensayos de inhibición. Cuando la placa de micro ELISA se sensibilizó con el péptido PY-1 de gp41, el péptido PV-1 de gpIIIa en solución fue capaz de inhibir la reacción de los sueros. Esta inhibición se demostró en 18 sueros VIH+ usando una sola concentración del péptido PV-1. Se observó que los sueros son inhibidos con diferente intensidad que va desde el 13% hasta el 88% de inhibición (figura 13).



**Figura 13. Inhibición de la reacción del péptido PY-1 de gp41 con el péptido PV-1 de gpIIIa.** En el eje de las abscisas se presentan los sueros probados: un suero VIH- y sueros VIH+ con el péptido PY-1 (barras blancas) y competido con PV-1 en solución (barras rellenas). Se indicó en cada caso el porcentaje de inhibición. En el eje de las ordenadas se grafica la absorbancia (405 nm)

La diferencia en los porcentajes de inhibición probablemente se debió a la población de anticuerpos policlonales presentes en el suero de las personas VIH+.

De la misma forma el péptido PY-1 en solución inhibió la reacción con el péptido PV-1 unido a la placa de ELISA del suero hiperinmune anti-PV-1 de conejo. La inhibición es dependiente de la concentración del péptido. Para demostrar esta inhibición se realizó una curva con el péptido PV-1 en un rango amplio de concentraciones (figura 14).



**Figura 14.** Curva de inhibición de la reacción del suero hiperinmune anti péptido PV-1 de gp133 con el péptido PY-1 de gp41.

En el eje de las abscisas se grafica el logaritmo de la concentración molar del péptido PY-1. Unido a la placa está el péptido PV-1 y en solución el péptido PY-1. En el eje de las ordenadas se grafica la absorbancia (405 nm).

Con estos resultados se comprobó que además de la probable homología estructural que presentan ambos péptidos tuvieron homología antigénica, ya que existe competencia entre ambos péptidos por unirse al mismo anticuerpo.

## DISCUSION

Debido a que actualmente no existe un tratamiento eficaz para los pacientes con PTA crónica (Ambriz R. *et al.*, 1987; Bertchold P. *et al.*, 1993; Anderson J.C. *et al.*, 1994; Giovani E. *et al.*, 1996, Letzky E.A. *et al.*, 1996), en este proyecto se abordó el problema de la identificación de los epitopos presentes en la membrana de las plaquetas responsables de la inducción de autoanticuerpos. Entre las diferentes proteínas blanco de estos anticuerpos, se ha demostrado que la gpIIIa (integrina  $\beta_3$ ) es la principal (Beardsley D.S. *et al.*, 1984; Fujisawa K. *et al.*, 1991; Kekomaki R. *et al.*, 1991; Fujisawa K. *et al.*, 1992; Fujisawa K. *et al.*, 1993; Hou M. *et al.*, 1995). Esta proteína junto con la gpIIb (integrina  $\alpha_{IIb}$ ) forma uno de los principales receptores de activación plaquetaria en los mecanismos hemostáticos de la sangre (Philips D.R. *et al.*, 1991). Por estos motivos se decidió buscar los epitopos de gpIIIa involucrados en la destrucción de las plaquetas en la PTA.

En el laboratorio, se había usado exitosamente el péptido sintético GM15 de la gp41 del virus de la inmunodeficiencia humana para realizar el diagnóstico de la infección por este virus (Gevorkian G. *et al.*, 1996) y los péptidos GK1 y GK2 del céstodo *taenia crassiceps* para el diagnóstico de la cisticercosis humana (Gevorkian *et al.*, 1996 a). Por lo que se decidió el uso de péptidos sintéticos como herramienta en la investigación de los antígenos de gpIIIa.

La predicción de los epitopos se hizo con el método de Hopp y Woods (Hopp F.P. *et al.*, 1981) que usa la secuencia lineal de aminoácidos de la proteína (figura 1, tabla I) ya que actualmente no existen métodos de predicción de antígenos que tomen en cuenta la estructura tridimensional de las proteínas. Se sabe que existen epitopos conformacionales debido al plegamiento de la proteína que permite a los aminoácidos, que normalmente no están juntos en la estructura primaria, sí lo estén en la estructura terciaria ((Honda S. *et al.*, 1995). De cualquier forma el método de Hopp y Woods sigue siendo el método más adecuado para la predicción de antígenos (Hopp F.P., 1993). Con este método se seleccionó tres epitopos: uno de la región intracitoplasmática y dos de la región extracitoplasmática de la gpIIIa.

La denominación y la secuencia de los péptidos es la siguiente:

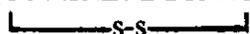
PV-1 (DRKEFAKFEEERARA aa 748-763),

PV-2 (KKFDREPYMTENTC aa 644-657),

PV-3 (GCPQEKEKSFTIKP aa 431-444),

Con el objetivo de ver si el antígeno PI<sup>A1</sup>, involucrado en púrpura neonatal aloinmune y en púrpura post-transfusional (Newman P.J., 1991; Mollison P.L. *et al.*, 1993), también era un antígeno en la púrpura autoinmune se incluyó en este estudio; se le llamó PV-4 para continuar con la terminología de los otros tres péptidos, y su secuencia es la siguiente:

PV-4 (CSDEALPLGSPRCDLK aa 52-67)



Este péptido está en forma de asa debido al puente disulfuro formado entre las dos cisteínas, tal como se encuentra en la proteína nativa (Calvete J.J. *et al.*, 1991).

Una vez seleccionados los epitopos se llevó a cabo la síntesis de los péptidos, usando un método manual. El método manual tiene la ventaja sobre los métodos automatizados de usar menor cantidad de reactivos por lo que resulta más económico, y sobre todo tiene la ventaja de poder monitorear cada paso de la síntesis, por lo que al final se obtienen productos más puros (Jones J., 1992; Pennington M.W. *et al.*, 1994).

El tamaño de 14 a 15 aminoácidos para cada uno de los péptidos permitió el uso directo como inmunógenos para la preparación de suero hiperinmune sin necesidad de acoplarlos a alguna proteína acarreadora como sucede con los haptenos, los cuales por su pequeña talla molecular no inducen la síntesis de anticuerpos al no poder entrecruzar los receptores de los linfocitos. De la misma forma en los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) se usó directamente los péptidos sin acoplarlos a ninguna proteína, obteniéndose muy buenos resultados.

Los pacientes con PTA tienen anticuerpos en la circulación sanguínea y también unidos a la membrana de las plaquetas (Fujisawa K. *et al.*, 1992; McMillan R. *et al.*, 1987; Fujisawa K. *et al.*, 1993). En este estudio los anticuerpos se buscaron tanto en el plasma (figura 3) como en los eluidos de la membrana de las plaquetas (figura 4) de 30 pacientes

con PTA crónica y 99 personas sanas como grupo control negativo. Con el ensayo inmunoenzimático (ELISA) empleado se encontró que en el plasma de los pacientes con PTA hay anticuerpos que reaccionan con los péptidos PV-1, PV-2 y PV-3 con una sensibilidad de 23% (7/30) y una especificidad del 100%, ya que ninguna de las personas sanas tuvieron anticuerpos contra estos péptidos. Si hay significancia estadística (modelos lineales generalizados: regresión logarítmica) entre el grupo de los pacientes estudiados y el grupo control, lo cual significa que los anticuerpos encontrados están relacionados con PTA. El péptido PV-4 resultó inespecífico ya que reaccionó con el 26% (8/30) de los pacientes con púrpura y con el 25% (25/99) de las personas sanas (figura 2), es decir PV-4 no es un antígeno específico de los pacientes con PTA. Esta reacción inespecífica puede deberse a la presencia de "anticuerpos naturales" en contra de éste epitopo ó a la presencia de anticuerpos dirigidos contra cualquier otro antígeno con reactividad cruzada para el péptido PV-4. Fue una sorpresa encontrar anticuerpos en contra de este epitopo tanto en personas sanas como en los pacientes con PTA y debido a la gran inespecificidad se decidió no tomarlo como epitopo relacionado con la PTA.

El resultado de los anticuerpos en el plasma (tabla II) indica que el 23% (7/30) de los pacientes estudiados tienen anticuerpos en contra de alguno de los péptidos PV-1, PV-2 o PV-3. De éstos, 4 reaccionan con un solo péptido y 3 con dos péptidos. Es decir existe heterogeneidad inmune tanto entre los pacientes como dentro de un mismo paciente. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por otros autores acerca de la presencia de anticuerpos con diferentes especificidades en el mismo paciente (McMillan R. *et al.*, 1987; Fujisawa K. *et al.*, 1991, 1992, 1993; Tsubakio T. *et al.*, 1987; Hou M. *et al.*, 1995) pero en ninguno de estos estudios se ha demostrado si los anticuerpos encontrados son los responsables de la destrucción plaquetaria.

Se sabe que en los pacientes con enfermedades autoinmunes existen tres tipos de anticuerpos: aquellos que son los causantes de la enfermedad autoinmune, aquellos que se producen como resultado de una activación policlonal inespecífica y que no tienen ningún papel patológico y finalmente aquellos que se producen en forma secundaria a la destrucción

celular (Aster R.H. *et al.*, 1995; Miescher P.A. *et al.*, 1992). En este estudio no se valoró de que tipo son los anticuerpos encontrados.

De los 30 pacientes con PTA crónica estudiados 25 se encontraban con púrpura activa (cifras bajas de plaquetas) y 5 se encontraban en remisión (cifras normales de plaquetas). Los 25 pacientes con púrpura activa se encontraban en tratamiento; ya sea con prednisona, prednisona más eritrocitos opsonizados o sólo con eritrocitos opsonizados. En 7 de estos pacientes se encontró la presencia de anticuerpos anti-péptidos a pesar del tratamiento, por lo que el porcentaje de los pacientes con PTA activa que presentaron anti-péptidos fue de 28% (7/25). Debido a que una de las funciones de la prednisona es la de disminuir la producción de anticuerpos (Boumpas D.T. *et al.*, 1993), se puede dificultar la detección de anticuerpos en pacientes bajo tratamiento. Sería muy interesante realizar un estudio transversal con una muestra grande de pacientes que incluyera a pacientes con púrpura activa sin tratamiento, pacientes con diferentes esquemas de tratamiento y pacientes en remisión, o también realizando un estudio longitudinal con algunos pacientes a lo largo de su evolución clínica en períodos de púrpura activa y de remisión. También sería conveniente realizar los estudios en un modelo de laboratorio, en el cual se puede controlar variables que no es posible controlar en los pacientes.

Se observó poca reactividad contra los péptidos en los eluidos de la membrana plaquetaria, que no fue debida a la técnica de elusión, porque se comprobó que los eluidos tenían IgG's. Esta baja reactividad probablemente fue debida a que las plaquetas que se encuentran en circulación no tienen unidos tantos anticuerpos como las plaquetas que están siendo fagocitadas por los macrófagos.

De los pacientes estudiados el 23% (7/30) eran del sexo masculino y el 77% (23/30) del sexo femenino ya que la PTA crónica afecta más a las mujeres (Aster R.H, 1994). En la figura 5 se observa que la presencia de anticuerpos anti-péptidos se relaciona principalmente con el sexo femenino, sin embargo no se puede concluir que los pacientes del sexo masculino no tengan anticuerpos ya que no hay significancia estadística entre estos dos grupos. Es decir los pacientes con PTA crónica tienen anticuerpos anti-péptidos

independientemente del sexo. Es conveniente analizar una muestra más grande de hombres para confirmar estos resultados.

En relación con la edad de los pacientes estudiados el 20% (6/30) fueron niños (4-11 años), el 3% (1/30) fue un adolescente (15 años) y el 77% (23/30) fueron adultos (18-74 años) y no se encontraron diferencias entre las diferentes edades y la presencia de anticuerpos. Todos los pacientes incluidos en el estudio tienen PTA crónica independientemente de la edad.

De aquellos pacientes de los cuales se tenía muestras de sangre extraídas consecutivamente en fechas diferentes (figuras 9 y 10), se observó que hay fluctuaciones en la presencia de los anticuerpos. Tal vez estas fluctuaciones sean adjudicables al tratamiento que están recibiendo los pacientes, o quizá se relacionen con los cambios en los niveles hormonales, hay que recordar que, las mujeres en general son más susceptibles a las enfermedades autoinmunes que los hombres. Y también estas fluctuaciones pueden deberse a la asociación con otras enfermedades, como ocurre en la PTA aguda de los niños que se presenta generalmente de manera secundaria a una infección viral (James N.G., 1994; Karpatkin S., 1985; Aster R.H., 1994)

Actualmente no existe una prueba de laboratorio que certifique el diagnóstico de la PTA (Lichtin A. *et al.*, 1996) y más bien el diagnóstico se realiza excluyendo otras causas de trombocitopenia. Los resultados obtenidos en este trabajo sustentan la posibilidad de tener esa técnica que hace falta. Esta técnica puede realizarse usando una mezcla de los diferentes péptidos ó como se hizo en este estudio haciendo la prueba con varios péptidos individuales. Es importante que la prueba se realice en diferentes ocasiones para evitar errores debido a las fluctuaciones en la presencia de los anticuerpos. Además de ser útiles como herramienta para el diagnóstico los péptidos sintéticos son alternativa de tratamiento; administrados a los pacientes pueden interferir la reacción de fijación de los anticuerpos a las plaquetas, inhibiendo su destrucción.

Hasta ahora se ha planteado que la púrpura trombocitopénica autoinmune es una enfermedad que afecta a las plaquetas. Se ha dejado en el olvido que el complejo gpIIb/IIIa (integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) se encuentra también en la membrana de las células endoteliales y que las

células endoteliales participan activamente en procesos homeostáticos de gran importancia como en la extravasación de leucocitos en inflamación y en la respuesta inmune. ¿Los anticuerpos anti gpIIIa involucrados en el daño de las plaquetas estarán involucrados también en daño endotelial?

Por otra parte y debido a que los sueros de pacientes VIH+ tuvieron anticuerpos que reaccionaron con el péptido PV-1 (figura 2), se estudió 89 sueros de personas infectadas con el VIH-1 y un suero hiperinmune anti-PV-1 preparado en conejos. El suero hiperinmune anti-PV-1 identificó una banda bien definida en la zona correspondiente a la gp41 del VIH-1, (figura 11). Este resultado sugirió que la gp41 tiene una región que está fijando los anticuerpos. El anticuerpo policlonal preparado en el conejo se obtuvo inmunizando únicamente con el péptido PV-1 (péptido pequeño de 14 aminoácidos) por lo cual la imagen de la banda con éste anticuerpo no fue igual a la que dan los anticuerpos de los pacientes VIH+ (los pacientes tienen anticuerpos contra diferentes partes de la proteína). Un resultado inesperado fue la observación de otras bandas menos definidas, que no corresponden con proteínas del VIH-1. Posiblemente estas bandas son proteínas de las células, en las que se realizó el cultivo viral.

El método de Gibrat de predicción de estructura secundaria de las proteínas, predijo que la región EKNEQELLELDKW (aa 655-667) de gp41 tiene una estructura de hélice  $\alpha$  homóloga al péptido PV-1. Esta secuencia se sintetizó y se le denominó PY-1. La estructura de esta región de gp41 fue confirmada con el estudio cristalográfico de la proteína (Chan D.C. *et al.*, 1997) y, posiblemente la región homóloga en gpIIIa tenga la misma configuración.

De los 89 sueros VIH+ estudiados el 65% (58/89) tuvieron anticuerpos que reaccionaron con el péptido PV-1 de gpIIIa y el 78% (70/89) tuvieron anticuerpos que reaccionaron con el péptido PY-1 de gp41 (figura 12). La especificidad serológica de los sueros positivos así como la reactividad cruzada de los péptidos PV-1 de gpIIIa y PY-1 de gp41 se comprobaron con los ensayos de inhibición (figuras 13 y 14). Con estos resultados se concluye que existe competencia entre los dos péptidos por unirse al mismo anticuerpo,

es decir los péptidos PV-1 de gpIIIa de plaquetas humanas y PY-1 de gp41 de VIH-1 tienen homología antigénica debida a su homología estructural.

Debido a que aproximadamente el 9% de los pacientes infectados con el VIH-1 que aún no han desarrollado SIDA tienen trombocitopenia y el 21% de los pacientes que ya desarrollaron SIDA tienen trombocitopenia que clínicamente es igual a la púrpura trombocitopénica autoinmune (Ratner L. *et al.*, 1992; Sloand E.M. *et al.*, 1992; Karpatkin S. *et al.*, 1995; Zauli G. *et al.*, 1996) se pensó que los anticuerpos anti-gp41 que cruzan con gpIIIa pudieran estar involucrados en la trombocitopenia. Aunque en este estudio no se encontró correlación entre la cantidad de plaquetas y la presencia de anticuerpos anti-PV-1 de gpIIIa, se realizó ensayos con plaquetas humanas de ELISA y citometría de flujo y no se encontró que los anticuerpos de los pacientes VIH+ ni el suero hiperinmune anti-PV-1 del conejo se unieran a las plaquetas (datos no mostrados). Estos resultados indican que estos anticuerpos no están involucrados en la trombocitopenia que presentaban 18 de los 58 pacientes que tuvieron anticuerpos contra el péptido PV-1.

La homología que existe entre la región intracitoplasmática de la gpIIIa (integrina  $\beta_3$ ) y la región extracápside de la gp41 del VIH-1 posiblemente, juega un papel importante en la disfunción de las células del sistema inmune. La gp IIIa en el receptor gpIIb-IIIa (integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) se expresa en la membrana de plaquetas, megacariocitos y células endoteliales y en el receptor  $\alpha_v\beta_3$  se expresa en las plaquetas y en todas las células del mesénquima. Las otras cadenas  $\beta$  se encuentran formando receptores en las membranas de todas las células humanas. Los linfocitos y monocitos tienen integrinas con cadenas  $\beta_1$  (VLA) y  $\beta_2$  (LFA-1 y Mac). Las cadenas  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  tienen entre ellas una gran homología, la cual es todavía mayor en el dominio intracitoplasmático (Albelda S.M. *et al.*, 1990; Clark E.A. *et al.*, 1995). Debido a la gran homología entre las cadenas beta de las integrinas, y a al hecho de que el virus de la inmunodeficiencia humana se replica en el interior de los linfocitos y monocitos, posiblemente la gp41 compite por los sitios de unión de las integrinas con las moléculas encargadas de transducir las señales de activación celular, llevando a la disfunción inmune de los pacientes infectados por el VIH-1.

Por otra parte la secuencia de aminoácidos del péptido PY-1 forma parte de una región conservada del dominio extracápside del virus, localizada cerca del dominio transmembranal, se ha demostrado que un péptido de esta región inhibe el proceso de fusión de membranas celulares mediado por el virus (Wild C. *et al.*, 1993). La secuencia del péptido PV-1 pertenece a una región intracitoplasmática estructural y funcionalmente conservada de las integrinas, la presencia de anticuerpos con reactividad cruzada con la superficie del virus y las proteínas componentes de la membrana celular puede contribuir a diversos fenómenos citopáticos, así como tener consecuencias, en la entrada del virus a las células y los mecanismos de fusión celular.

## CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se alcanzó el objetivo principal, que era encontrar el epitopo o epitopos de la gpIIIa (integrina  $\beta_3$ ) involucrados en la producción de autoanticuerpos en los pacientes con PTA, a través del uso de péptidos sintéticos, como herramienta de trabajo.

De esta investigación se desprenden las conclusiones siguientes:

1) En el plasma de los pacientes con PTA hay anticuerpos que reconocen a péptidos de la proteína gpIIIa (integrina  $\beta_3$ ).

2) En la membrana de las plaquetas hay anticuerpos en contra de los mismos péptidos, pero en menor cantidad.

3) Se demostró que efectivamente los pacientes con púrpura activa son los que tienen anticuerpos aún que estaban recibiendo tratamiento (prednisona, prednisona más eritrocitos opsonizados o eritrocitos opsonizados únicamente).

4) Hay heterogeneidad inmune entre los pacientes (no todos los plasmas reconocen los mismos péptidos).

5) Hay heterogeneidad inmune en el mismo paciente (un mismo plasma reconoce diferentes péptidos).

6) Queda por estudiar si estos anticuerpos son los causantes de la trombocitopenia, ó son anticuerpos de presentación secundaria a la destrucción plaquetaria.

7) Es necesario un modelo murino para el estudio de la PTA.

8) Se encontró homología antigénica entre una región del dominio intracitoplasmático de la gpIIIa (integrina  $\beta_3$ ) y una región del dominio extracápside de la gp41 del VIH-1.

## APENDICE I

### INTEGRINAS

Las integrinas son glucoproteínas presentes en las membranas celulares. Estas glucoproteínas son receptores que interactúan con proteínas de la matriz extracelular, o con proteínas de otras células para realizar procesos biológicos de gran importancia como el desarrollo embrionario, reparación de heridas, apoptosis, hemostasis, crecimiento tumoral y metástasis, "homing" y activación de leucocitos y el mantenimiento de la integridad vascular (Albelda S.M. *et al.*, 1990; Sonnenberg A., 1993; Clark E.A., 1995). Las integrinas son heterodímeros formados por una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ , unidas en forma no covalente. A la fecha se han identificado 16 cadenas  $\alpha$  y 8 cadenas  $\beta$ . La combinación de una de las diferentes cadenas  $\alpha$  con una de las diferentes cadenas  $\beta$  da lugar a la formación de más de 20 receptores (Clark E.A., 1995; Frenette P.S. *et al.*, 1996). Las plaquetas expresan en su membrana por lo menos 5 miembros de la familia de las integrinas, los neutrófilos 3, los monocitos 8, los linfocitos 7 y las células endoteliales 6 (Smith S.S. *et al.*, 1993).

La función de las integrinas es la de comunicar a la célula las señales de activación del exterior hacia el interior de las mismas y como resultado se obtendrán señales del interior de las células hacia el exterior. Cuando las integrinas unen a sus ligandos (fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, colágena, etc.) se forman agregados de estos receptores en lo que se llama "adhesiones focales". En las adhesiones focales hay interacción de las regiones citoplasmáticas de las integrinas con complejos intracelulares del citoesqueleto (talina, vinculina,  $\alpha$ -actinina,  $\beta_3$  endonexina), para después unir filamentos de actina, lo que finalmente termina en activación celular. Esta función está regulada por fosforilación en serina, treonina y tirosina del dominio intracitoplasmático de la cadena  $\beta$ , y la participación de cinasas de tirosina (fak, syk, fyn lyn) (Reska A.A. *et al.*, 1992; Horwitz A.F., 1997, Shattil S.J. *et al.*, 1997; Shattil S.J. *et al.*, 1995; Kashiwagi H. *et al.*, 1996; Law D.A., 1996; Ezumi Y., 1995).

La afinidad de la interacción de estas proteínas con sus ligandos es variable, por ejemplo entre  $\beta_1$  y  $\alpha$ -actinina K tiene un valor de  $1.6 \times 10^{-8}$  y entre  $\beta_3$  y  $\alpha$ -actinina el valor es de  $2.1 \times 10^{-6}$  (Otey C.A. *et al.*, 1990).

No solamente los dominios extracelulares de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  regulan la especificidad de reconocimiento del ligando. El dominio intracelular de la cadena  $\beta$  también es indispensable para que se realice la unión con el ligando, además de ser el encargado de realizar las adhesiones focales (LaFlamme S.E. *et al.*, 1992; Shattil S.J. *et al.*, 1997; Loh E. *et al.*, 1996; Chen Y-P. *et al.*, 1994; Wang R., 1994; Liu X.Y. *et al.*, 1996; Haas T.A. *et al.*, 1996).

A excepción de las cadenas  $\beta_4$  y  $\beta_8$ , todas las cadenas  $\beta$  tienen entre ellas 40-48% de homología en general y en la región citoplasmática ésta homología aumenta hasta 80%. La homología es tan grande que se puede intercambiar los dominios intracelulares de  $\beta_1$  y  $\beta_3$  y la quimera resultante es capaz de realizar sus funciones (Solowska J. *et al.*, 1991).

Las integrinas se clasifican en tres grandes grupos de acuerdo a la cadena  $\beta$  que expresan. (Albelda S.M. *et al.*, 1990):

#### **Integrinas con $\beta_1$**

A esta subfamilia se le conoce también con el nombre VLA ("very late antigens") o antígenos tardíos. Son moléculas que aparecen en la superficie de los linfocitos varios días después de la activación celular. Pertenecen a esta familia el clásico receptor de fibronectina VLA-5 ( $\alpha_5\beta_1$ ) (GPIc-IIa), otro receptor para fibronectina ( $\alpha_v\beta_1$ ) y el receptor de laminina VLA-6 ( $\alpha_6\beta_1$ ). Estos receptores tienen ligandos únicos. Hay otros miembros de esta familia que tienen más de un ligando, como la integrina VLA-2 ( $\alpha_2\beta_1$ ) (GPIa-IIa) (CD49b/CD29) (ECMR II) que actúa como receptor de colágena en las plaquetas y fibroblastos, como receptor de colágena y laminina sobre las células endoteliales y parece ser que sirve como receptor para el ecovirus 1. La integrina VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ ) se sobreexpresa al ocurrir la activación de linfocitos T, y cuando éstos se convierten en células de memoria (Santoro S.A. *et al.*, 1995).

### **Integrinas con $\beta 2$**

Esta subfamilia es mejor conocida como LEU-CAMs o antígenos CD11/CD18. Está formada por 3 receptores:

- 1) LFA-1 ( $\alpha_L\beta_2$ ) (CD11a/CD18) se expresa sobre la mayoría de los leucocitos, donde tiene un papel importante en las interacciones leucocito-leucocito y leucocito-célula endotelial. LFA-1 está involucrado en las funciones de los linfocitos T (NK, Th, ADCC). El ligando de LFA-1 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, el ICAM-1. ICAM-1 es también el principal receptor de los rinovirus.
- 2) MAC-1 ( $\alpha_M\beta_2$ ) (CD11b/CD18) (Mo-1) ( $CR_3$ ) se expresa sobre neutrófilos, monocitos y algunos linfocitos. Probablemente se une a ICAM-1 pero tiene un repertorio de ligandos mucho mayor, ya que también une  $C_3bi$  (un producto de la degradación de  $C_3$ ), factor X de la coagulación, fibrinógeno y endotoxinas.
- 3) GP150,95 ( $\alpha_X\beta_2$ ) es el menos conocido de estos 3 receptores.

### **Integrinas con $\beta 3$**

A los receptores de esta subfamilia también se les llama citoadhesinas y son los siguientes:

- 1)  $\alpha_V\beta_3$  (CD51/CD61) es receptor de vitronectina y también está involucrado en interacciones célula-célula, ya que anticuerpos anti- $\alpha_V\beta_3$  pueden bloquear la capacidad de los macrófagos de fagocitar a los neutrófilos y linfocitos en apoptosis. Este receptor tiene mayor distribución que GPIIb-IIIa, ya que aparece en todas las células del mesénquima.
- 2) GPIIb-IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) (CD49/CD61). Esta integrina fue la primera que se caracterizó. Al igual que otras integrinas GPIIb-IIIa necesita dos señales de activación. Primero se activa con trombina, colágena o ADP; solo una vez que se ha activado es capaz de unir a su ligando. Los ligandos pueden ser fibrinógeno, fibronectina, vitronectina y factor Von Willebrand. Todos ellos tienen una secuencia común de aminoácidos arg-gli-asp (RGD) que es la que interactúa con el receptor. La cadena gamma del fibrinógeno tiene además

otra secuencia de aminoácidos que también es reconocida por ésta integrina (Sims P.J. *et al.*, 1991; Phillips D.R., 1991).

## APENDICE II

### GLOSARIO DE ABREVIATURAS

PTA: púrpura trombocitopénica autoinmune

Boc: t-butoxicarbonil

TFA: ácido trifluoracético

DCM: diclorometano

DMF: di-metil-formamida

DIEA: di-isopropil-etil-amina

HOBT: hidroxibenzotriazol

DCC: di-ciclo-hexil-carbodiimida

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético

ELISA: ensayo inmunoenzimático

VIH-1: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

## BIBLIOGRAFIA

- Albelda S.M., Buck C.A. (1990). Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 4:2868-2880.
- Ambriz R., Muñoz R., Pizzuto J., Quintanar E., Morales M., Avilés A. (1987). Low-dose autologous in vitro opsonized erythrocytes. *Arch. Intern. Med.* 147: 105-108.
- Andersen J.C. (1994). Response of resistant idiopathic thrombocytopenic purpura to pulsed high-dose dexamethasone therapy. *N. J. Engl. Med.* 330(22): 1560-1564.
- Aster R.H. George J.N. (1995). Thrombocytopenia due to enhanced platelet destruction by immunologic mechanisms in "Williams Hematology". 5th ed. Ed. Beutler, Lichtman, Collier. pp 1370-1384.
- Bajt M.L., Ginsberg M.H., Frelinger A.L., Berndt M.C., Loftus J.C. (1992). A spontaneous mutation of integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (platelet glycoprotein IIb-IIIa) helps define a ligand binding site. *J Biol. Chem.* 267(6):3789-3794.
- Beardsley D.S., Spiegel J.E., Jacobs M.M., Handin R.I., Lux IV S.E. (1984). Platelet membrane glycoprotein contains target antigens that bind anti-platelet antibodies in immune thrombocytopenias. *J. Clin. Invest.* 74:1701-1707.
- Berchtold P., Wenger M. (1993). Autoantibodies against platelet glycoproteins in autoimmune thrombocytopenic purpura: their clinical significance and response to treatment. *Blood* 81(5):1246-1250.
- Bettaieb A., Fromont P., Louache F. (1992). Presence of cross-reactive antibody between human immunodeficiency virus (HIV) and platelet glycoproteins in HIV-related immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 80:162-169.
- Bettaieb A., Oksenhendler E., Duedari N., Bierling P. (1996). Cross reactive antibodies between HIV-gp120 and platelet gpIIIa (CD61) in HIV-related immune thrombocytopenic purpura. *Clin. Exp. Immunol.* 103:19-23.
- Boumpas D.T., Chrousos G.P., Wilder R.L., Cupps T.R., Balow J.E. (1993). Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann. Int. Med.* 119(12): 1198-1208.
- Calvete J.J. (1994). Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. *Thromb. Haemostas.* 72(1):1-15.
- Calvete J.J., Henschen A., González-Rodríguez J. (1991). Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIIa. A disulphide pattern for the beta-subunits of the integrin family. *Biochem. J.* 274:63-71.
- Chan D.C., Fass D., Berger J.M., Kim P.S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89:263-267.
- Clark E.A., Brugge J.S. (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268:233-239.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Clark E.A., Shattil S.J., Ginsberg M.H. Bolen J., Brugge J.S. (1994). Regulation of the protein tyrosine kinase pp72<sup>syk</sup> by platelet agonists and the integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . *J. Biol. Chem.* 269(46):28859-28864.

Chem Y-P., O'Toole T.E., Shipley T., Forsyth J., LaFlamme S.E., Yamada K.M., Shattil S.J., Ginsberg M.H.(1994). "Inside-out" signal transduction inhibited by isolated integrin cytoplasmic domains. *J. Biol. Chem.* 269:18307-18310.

Chen Y-P., Djaffar I., Pidard D., Steiner B., Cieutat A-M., Caen J.P., Rosa J-P. (1992). Ser-752-pro mutation in the cytoplasmic domain of integrin  $\beta_3$  subunit and defective activation of platelet integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (glycoprotein IIb-IIIa) in a variant of Glanzmann thrombasthenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10169-10173.

Eddleston M., de la Torre J.C., Xu J.Y. (1993). Molecular mimicry accompanying hiv-1 infection: human monoclonal antibodies that bind to gp41 and astrocytes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10:939-944.

Ezumi Y., Takayama H., Okuma M.(1995). Differential regulation of protein-tyrosine phosphatases by integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  through cytoskeletal reorganization and tyrosine phosphorylation in human platelets. *J. Biol. Chem.* 270:1197-11934.

Ferrell, Jr.J.E., Martin G.S. (1989). Tyrosine-specific protein phosphorylation is regulated by glycoprotein IIb-IIIa in platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2234-2238.

Fitzgerald L.A., Steiner B., Rall Jr. S.C., Lo S., Phillips D.R. (1987). Protein sequence of endothelial glycoprotein IIIa derived from a cDNA clone. *J. Biol. Chem.* 262(9): 3936-3939.

Frchet P., Uzan G., Thevenon D., Denarier E., Prandini M.H., Marguerie G. (1990). GPIIb and GPIIIa amino acid sequences deduced from human megakaryocyte cDNAs. *Mol. Biol. Rep.* 14:27-33.

Frenette P.S., Wagner D.D. (1996). Adhesion molecules-part I. *N. Eng. J. Med.* 334(23):1526-1529.

Frenette P.S., Wagner D.D. (1996). Adhesion molecules-part II. *N. Eng. J. Med.* 335(1):43-45

Fujisawa K., O'toole T.E., Tani P., Loftus J.C., Plow E.F. (1991). Autoantibodies to the presumptive cytoplasmic domain of platelet glycoprotein IIIa in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 77(10):2207-2213.

Fujisawa K., Tani P., McMillan R. (1993). Platelet-associated antibody to glycoprotein IIb/IIIa from chronic immune thrombocytopenic purpura patients often binds to divalent cation-dependent antigens. *Blood* 81(5):1284-1289.

Fujisawa K., Tani P., O'toole T.E., Ginsberg M.H., McMillan R. (1992). Different specificities of platelet-associated and plasma autoantibodies to platelet gpIIb-IIIa in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 79(6):1441-1446.

Fujisawa K., Tani P., Piro L., McMillan R. (1993). Platelet-associated antibody to glycoprotein IIb/IIIa from chronic immune thrombocytopenic purpura patients often binds to divalent cation-dependent antigens. *Blood* 81:1284-1289.

Gevorkian G., Manoutcharian K., Larralde C. (1996a). Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol. Lett.* 49:185-189.

Gevorkian G., Soler C., Viveros M., Padilla A., Govezensky T., Larralde C. (1996b). Serologic reactivity of a synthetic peptide from human immunodeficiency type 1 gp41 with sera of a mexican population. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3(6): 651-653

Gibrat J.F., Garnier J., Robson B. (1987). Further developments of protein secondary structure prediction using information theory. *J. Mol. Biol.* 198:425-443.

Golding H., Shearer G.M., Hillman K. (1989). Common epitope in human immunodeficiency virus (HIV-1) gp41 and HLA class II elicits immunosuppressive autoantibodies capable of contributing to immune dysfunction in HIV 1 infected individuals. *J. Clin. Invest.* 83:1430-1435.

Giovanni E., Messori C., Longo G., Bertesi M. (1996). Long-term salvage treatment by cyclosporin in refractory autoimmune haematological disorders. *Br. J. Haematol.* 93: 341-344.

Godeau B., Oksenhendler E., Bierling P. (1993). *Am. J. Hematol.* 44:70-72.

Golden A., Brugge J.S., Shattil S.J. (1990). Role of platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa in agonist-induced tyrosine phosphorylation of platelet proteins. *J. Biol. Chem.* 111(6):3117-3127.

Haas T.A., Plow E.F. (1996). The cytoplasmic domain of alpha IIb beta3. A ternary complex of the integrin alpha and beta subunits and a divalent cation. *J. Biol. Chem.* 271:6017-6026.

Harrington W.J., Minnich V., Hollingsworth J.W., Moore C.V. (1951). Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J. Lab. Clin. Med.* 38(1): 45-49.

Hiraiwa A., Matsukage A., Shiku H., Takahashi T., Naito K., Yamada K. (1987). Purification and partial amino acid sequence of human platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa. *Blood* 69(2):560-564.

Honda S., Honda Y., Bauer B., Ruan C., Kunicki T.J. (1995). The impact of three-dimensional structure on the expression of PL<sup>A</sup> alloantigens on human integrin beta3. *Blood* 86(1): 234-242.

Hopp T.P., Woods K.R. (1981). Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3824-3828.

Hopp T.P. (1993). Retrospective: 12 years of antigenic determinant predictions, and more. *Pept. Res.* 6(4):183-190.

Horwitz A.F. (1997). Integrins and health. *Scientific. Am.* May 68-75.

Hou M., Stockelberg D., Kutti J., Wadenvik H. (1995). Glycoprotein IIb/IIIa autoantigenic repertoire in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* 91:971-975.

Hynes R.O. (1991). The complexity of platelet adhesion to extracellular matrices. *Thromb. Haemostas.* 66(1): 40-42.

James N.G., Mayez A. El-Harake., Gary E.R. (1994). Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *N. Eng. J. Med.* 331(18):1207-1211.

James N.G., Steven H.W., Gary E.R., Jeffrey S.W., Louis M.A., Penny J.B., Blanchette V.S., Bussel J.B., Cines D.B., Kelton J.G., Lichtin A.E., McMillan R., Okerbloom J.A., Regan D.H., Warrier I. (1996). ITP: a practice guideline developed by explicit methods for the american society of hematology. *Blood* 88(1):3-40.

- Jones J. (1992). Amino acid and peptide synthesis. 1st ed. Oxford University Press.
- Kaplan C., Morinet F., Cartron J. (1992). Virus-induced autoimmune thrombocytopenia and neutropenia. *Sem. Hematol.* 29(1):34-44.
- Karpatkin S. (1985). Autoimmune thrombocytopenic purpura. *Sem. Hematol.* 22(4): 260-288.
- Karpatkin S., Nardi M.A., Hymes K.B., (1995). Sequestration of anti-platelet GPIIIa antibody in rheumatoid factor immune complexes of human immunodeficiency virus 1 thrombocytopenic patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2263-2267.
- Kashiwagi H., Eigenthaler M., Ginsberg M.H., Shattil S.J. (1996). Affinity modulation of the platelet fibrinogen receptor by beta3-endonexin, a selective binding partner of the beta3 integrin cytoplasmic tail. *Blood* 88:140a(abstract).
- Kekomaki R., Dawson B., McFarland J., Kunicki T.J. (1991). Localization of human platelet autoantigens to the cysteine-rich region of glycoprotein IIIa. *J. Clin. Invest.* 88:847-854.
- Kelton J., Gibbons S. (1982). Autoimmune platelet destruction: ITP. *Sem. Thromb. Hemost.* 8(2): 83-104.
- Kiefel V., Santoso S., Mueller-Eckhardt C. (1992). Serological, biochemical, and molecular aspects of platelet autoantigens. *Sem. Hematol.* 29(1): 26-33.
- Kouns W.C., Fox C.F., Lamoreaux W.J. Coons L.B., Jennings L.K. (1991). The effect of glycoprotein IIb-IIIa receptor occupancy on the cytoskeleton of resting and activated platelets. *J. Biol. Chem.* 266(21):13891-13900.
- Kroll M.H., Schafer A.I. (1989). Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood* 74(4):1181-1195.
- Kuijpers R.W.A.M., Simsek S., faber N.M., Goldschmeding R., van Wermerkerken R.K.V., von dem Borne A.E.G.Kr. (1993). single point mutation in human glycoprotein IIIa is associated with a new platelet-specific alloantigen (Mo) involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 81(1):70-76.
- LaFlamme S.E., Steven K.A., Yamada K.M., (1992). Regulation of fibronectin receptor distribution. *J. Cell Biol.* 117(2): 437-447.
- Lanza F., Kieffer N., Phillips D.R., Fitzgerald L.A. (1990). Characterization of the human platelet glycoprotein IIIa gene. *J. Biol. Chem.* 265(30): 18098-18103.
- Lanza F., Stierlé A., Fournier D., Morales M., André G., Nurden A.T., Cazenave J-P. (1991). A new variant of Glanzmann's thrombasthenia (Strasbourg I). *J. Clin. Invest.* 89:1995-2004.
- Law D.A., Nannizzi-Alaimo L., Phillips D.R. (1996). Outside-in signal transduction: alphaIIb beta3 (GPIIb-IIIa) tyrosine phosphorylation induced by platelet aggregation. *J. Biol. Chem.* 271:10811-10815.
- Lee M.R., Ho D.D., Gurney M.E. (1987). Functional interaction and partial homology between human immunodeficiency virus and neuroleukin. *Science* 237:1047-1051.
- Letsky E.A., Greaves M. (1996). Guidelines on the investigation and management of thrombocytopenia in pregnancy and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Br. J. Haematol.* 95: 21-26.

Levy-Toledano S., Gallet C., Nadal F., Bryckaert M., Maclouf J., Rosa J-P. (1997). Phosphorylation and dephosphorylation mechanisms in platelet function: a tightly regulated balance. *Thromb. Haemost.* 78(1):226-233.

Lichtin A. (1996). The ITP practice guideline: what, why and for whom? *Blood* 88(1): 1-2.

Liu X.Y., Timmons S., Lin Y.Z., Hawiger J. (1996). Identification of a functionally important sequence in the cytoplasmic tail of integrin beta3 by using cell-permeable peptide analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11819-11824.

Loftus J.C., O'Toole T.E., Plow E.F., Glass A., Frelinger A.L., Ginsberg M.H. (1990). A beta3 integrin mutation abolishes ligand binding and alters divalent cation-dependent conformation. *Science* 249:915-918.

Loh E., Qi W.W., Vilaire G., Bennett J.S. (1996). Effect of cytoplasmic domain mutations on the agonist-stimulated ligand binding activity of the platelet integrin alpha IIb-beta3. *J. Biol. Chem.* 271:30233-30241.

Martínez M.C., Quintana G.S. (1996). Fisiología de la hemostasia primaria y Fisiología de la hemostasia secundaria en "Manual de hemostasis y trombosis". 1a. ed. Ed. Prado pp 5-48.

Maslanka K., Yassai M., Gorski J. (1996). Molecular identification of T cells that respond in a primary bulk culture to a peptide derived from a platelet glycoprotein implicated in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *J. Clin. Invest.* 98(8): 1802-1808.

Mc Verry B.A., (1985). Management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults. *Br. J. Haematol.* 59: 203-208.

McMillan R., Tani P., millard F., Berchtold L., renschaw L., Woods V.L. (1987). Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood* 70:1040-1045.

Merrifield R.B. (1963). Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2153.

Miescher P.A., Tucci A., Beris P., Favre H. (1992). Autoimmune hemolytic anemia and/or thrombocytopenia associated with lupus parameters. *Sem. Hematol.* 29(1):13-17.

Mollison P.L., Engelfried R., Contreras M. (1993). Immunology of leucocytes, platelets and plasma components, in "Blood Transfusion in Clinical Medicine". 9th ed. Blackwell Scientific Publications. pp 617-632.

Newman P.J. (1991). Platelet gpIIb-IIIa: molecular variations and alloantigens. *Thromb. Haemostas.* 66(1):111-117.

Newman P.J., Derbes R.S. Aster R.H. (1989). The human platelet alloantigens, PL<sup>a1</sup> and PL<sup>a2</sup>, are associated with leucine<sup>33</sup>/proline<sup>33</sup> amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J. Clin. Invest.* 83:1778-1781.

Oksenhendler E., Bierling P., Chevret S., Delfraissy J.F., Laurian Y., Clauvel J.P. (1993). *Blood* 82:29-32.

Otey C.A., Pavalko F.M., Burridge K. (1990). An interaction between alfa-actinina and the beta1 integrin subunit in vitro. *J. Cell Biol.* 111:721-729.

Pennington M.W., Dunn B.M. (1994). Peptide synthesis protocols. *Meth. Mol. Biol.* 35: 173.

- Phillips D.R., Scaborough R.M. (1991). GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 65:359-362.
- Pizzuto J., Ambriz R. (1984). Therapeutic experience on 934 adults with ITP: multicentric trial of the cooperative latin american group in hemostasis and thrombosis. *Blood* 64(6): 1179-1183.
- Ratner L. (1989). Human immunodeficiency virus-associated autoimmune thrombocytopenic purpura: a review. *Am. J. Med.* 86: 194-198.
- Reiher III W.E., Blalock J.E., Brunck T.K. (1986). Sequence homology between acquired immunodeficiency syndrome virus envelope protein and interleukin 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9188-9192.
- Reszka A.A., Yokichi H., Horwitz A.F. (1992). Identification of amino acid sequences in the integrin beta 1 cytoplasmic domain implicated in cytoskeletal association. *J. Cell Biol.* 117(6): 1321-1330.
- Rittenhouse S.E. (1996). Phosphoinositide 3-kinase activation and platelet function. *Blood* 88(12):4401-4414.
- Santoro S.A., Zutter M.M. (1995). The alfa2beta1 integrin: a collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb. Haemost.* 74(3):813-821.
- Schwartz R.S. (1993). Autoimmunity and autoimmune diseases. in *Fundamental immunology*. 3rd ed. edited by Paul W.E. Raven Press, LTD., New York pp 1075.
- Shattil S.J., Gao J., Kashiwagi H. (1997). Not just another pretty face: regulation of platelet function at the cytoplasmic face of integrin alfaIIb beta3. *Thromb. Haemostat.* 220-225.
- Shattil S.J., Haimovich B., Cunningham M., Lipfert L., Parsons J.T., Ginsberg M.H., Brugge J.S. (1994). Tyrosine phosphorylation of pp125<sup>FAK</sup> in platelets requires coordinated signaling through integrin and agonist receptors. *J. Biol. Chem.* 269(20):14738-14745.
- Shattil S.J., O'toole T., Eigenthaler M., Thon V., Williams M., Babior B.M., Ginsberg M.H. (1995). beta3-endonexin, a novel polypeptide that interacts specifically with the cytoplasmic tail of the integrin beta3 subunit. *J. Cell Biol.* 131:807-816.
- Shulman N.R., Jordan Jr. J.V. (1987). Platelet immunology. In *Hemostasis and Thrombosis*. 2nd ed. Edited by Colman R.W. J.B. Lippincott Co. Philadelphia. 493-509.
- Sims P.J., Ginsberg M.H., Plow E.F., Shattil S.J., (1991). Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.* 266(12): 73-45-7352.
- Skogen B., Wang R., McFarland J.G., Newman P.J. (1996). A dinucleotide deletion in exon 4 of the PLA2 allelic form of glycoprotein IIIa: implications for the correlation of serologic versus genotypic analysis of human platelet alloantigens. *Blood* 88(10): 3831-3836.
- Sloand E.M., Klein H.G., Banks S.M. (1992). Epidemiology of thrombocytopenia in HIV infection. *Eur. J. Haematol.* 48: 168-72.
- Smyth S.S., Joneckis C.C., Parise L.V. (1993). Regulation of vascular integrins. *Blood* 81(11):2827-2843.

Solowska J., Edelman J.M., Albelda S.M., Buck C.A. (1991). Cytoplasmic and transmembrane domains of integrin beta1 y beta3 subunits are functionally interchangeable. *J. Cell Biol.* 114(85): 1079-1088.

Sonnenberg A. (1993). Integrins and their ligands. *Current topics in microbiology and immunology.* 184:8-35.

Stoiber H., Thielens N.M., Ebenbichler C., Arlaud G.J., Dierich M.P. (1994). The envelope glycoprotein of HIV-1 gp120 and human complement protein C1q bind to the same peptides derived from three different regions of gp41, the transmembrane glycoprotein of HIV-1, and share antigenic homology. *Eur. J. Immunol.* 24:294-300.

Sultan C., Plantavid M., Bachelot C., Grondin P., Breton M., Mauco G, Lévy-Toledano S., Caen J.P. Chap H. (1991). Involvement of platelet glycoprotein IIb-IIIa (alphaIIb-beta3 integrin) in thrombin-induced synthesis of phosphatidylinositol 3',4'-biphosphate. *J. Biol. Chem.* 266(35):23554-23557.

Tam J.P., Heath W.F., Merrifield R.B. (1986). Mechanisms for the removal of benzyl protecting groups in synthetic peptides by trifluoromethanesulfonic acid-trifluoroacetic acid-dimethyl sulfide. *J. Am. Chem. Soc.* 108:5242-5251.

Trujillo J.R., McLane M.F., Lee T.H., Essex M. (1993). Molecular mimicry between the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop and human brain proteins. *J. Virol.* 67:7711-7715.

Tsubakio T., Tani P., Woods Jr V.L., Mcmillan R. (1987). Autoantibodies against platelet GPIIb/IIIa in chronic ITP react with different epitopes. *Br. J. Haematol.* 67:345-348.

van Leeuwen E.F., van der Ven J.Th.M., engelfriet C.P., van dem Borne. (1982). Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 59(1): 23-26.

Wang R., Ambruso D.R.; Newman P.J. (1994). Truncation in the cytoplasmic domain of integrin beta3 subunit confers an inactivated state to the alphaIIb beta3 complex in a variant type of Glanzmann thrombasthenia. *Blood* 84:244a(abstract).

Wang R., Furihata K., McFarland J.G., friedman K., Aster R.H., Newman P.J. (1992). An amino acid polymorphism within the RGD binding domain of platelet membrane glycoprotein IIIa is responsible for the formation of the Pen<sup>a</sup>/Pen<sup>b</sup> alloantigen system. *J. Clin. Invest.* 90: 2038-2043.

Wang R., McFarland J.C., Kekomaki R., Newman P.J. (1993). Amino acid 489 is encoded by a mutational "Hot Spot" on the beta3 integrin chain: the CA/TU human platelet alloantigen system. *Blood* 82(11):3386-3391.

Waters A.H. (1992). Autoimmune thrombocytopenia: clinical aspects. *Sem. Hematol.* 29(1): 18-25.

Wendell F.R. (1983). Treatment of chronic immune thrombocytopenia. *Clin. Haematol.* 12(1): 267-284.

Wild C., Greenwell T., Matthews T. (1993). A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9: 1051-1053.

Yamada M., Zurbriggen A., Oldstone M.B.A., Fujinami R., (1991). Common immunologic determinant between human immunodeficiency virus type 1 gp41 and astrocytes. *J. Virol.* 65:1370-1376.

Zauli G., Catani L., Gibellini D. (1996). Impaired survival of bone marrow GpIIb/IIIa+ megakariocytic cells as an additional pathogenic mechanism of HIV-1-related thrombocytopenia. *Br. J. Haematol.* 92: 425-443.

Zlatkis A., Breitmaier E., Jung G. (1980). *Introducción a la química orgánica*. 1a. ed. McGRAW-HILL BOOK México. pp 508-509.

Zimrin A.B., Eisman R., Vilari G., Schwartz E., Bennet J.S., Poncz M. (1988). Structure of platelet glycoprotein IIIa. *J. Clin. Invest.* 81:1470-1475.

Zimrin A.B., Gidwitz S., Lord S., Schwartz E., Bennet J.S. (1990). The genomic organization of platelet glycoprotein IIIa. *J. Biol. Chem.* 265(15):8590-8595.