

00544 4
24.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
"SALVADOR ZUBIRAN"
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA**

**DETECCION DE ANTICUERPOS ANTIPLAQUETAS
MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO
EN NIÑOS Y ADULTOS**

**T E S I S D E P O S G R A D O
ESPECIALIDAD EN BIOQUIMICA CLINICA
AREA DE HEMATOLOGIA
P R E S E N T A :
LINA TERESA ROMERO GUZMAN**

**ASESOR: Q.F.B. JOSEFA PIEDRAS ROSS
DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGIA, INN.
PROFESOR TITULAR DE LA ESPECIALIDAD
EN BIOQUIMICA CLINICA**



1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

26863 0



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.

DEDICATORIA.

A mi hermana

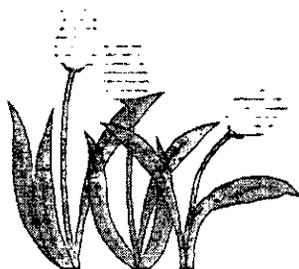
Ana María, por su cariño y apoyo

A mi hija

Lina Arumi, con todo mi amor

A mi sobrina

Ana Elena, por la alegría que representa



A la *Dra. Dolores Lastra*

por la confianza que depositó en mí

A la *Dra Magdalena Oliva*

en su memoria

A la *2.F.B. Josefa Piedras Ross*

por su invaluable amistad

INDICE

| | Página |
|---|--------|
| I- INTRODUCCION | 4 |
| II- GENERALIDADES | 6 |
| 2.1 Púrpura trombocitopénica idiopática | |
| 2.2 Incidencia | |
| 2.3 Características clínicas de la PTI en niños y adultos | |
| 2.4 Etiología y patogénesis | |
| 2.4.1 PTI aguda | |
| 2.4.2 PTI crónica | |
| 2.5 Cinética de las plaquetas | |
| 2.6 Anticuerpos antiplaquetarios | |
| 2.7 Mecanismo de destrucción de las plaquetas por respuesta Inmune | |
| 2.8 Sitios de destrucción de las plaquetas en PTI crónica | |
| III- METODOS DE ESTUDIO | 18 |
| 3.1 Antecedentes | |
| 3.2 Técnicas basadas en activación plaquetaria | |
| 3.3 Pruebas inmunológicas | |
| 3.4 Método de inmuno-ensayo-enzimático (ELISA) | |
| 3.5 Inmunofluorescencia | |
| 3.5.1 Citometría de flujo | |
| IV- CITOMETRIA DE FLUJO | 24 |
| 4.1 Fundamento | |
| 4.2 Citómetro de flujo | |
| 4.3 Operación | |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| V- | ANALISIS ESTADISTICO. | 30 |
| | 5.1 Método estadístico | |
| | 5.2 Valores predictivos | |
| | 5.3 Probabilidad exacta de Fisher | |
| VI- | OBJETIVO | 34 |
| VII- | MATERIAL Y METODOS . | 35 |
| | 7.1 Material | |
| | 7.2 Métodos | |
| | 7.2.1 Muestra | |
| | 7.2.2 Reactivos | |
| | 7.2.3 Procedimiento | |
| | 7.2.4 Condición y operación del citómetro de flujo | |
| VIII- | RESULTADOS | 41 |
| | 8.1 Cifras de referencia | |
| | 8.2 Valores de IgGAP | |
| | 8.3 Cálculos estadísticos | |
| IX- | DISCUSION | 50 |
| X- | CONCLUSIONES | 55 |
| XI- | BIBLIOGRAFIA | 57 |

I INTRODUCCION

1.1 ANTECEDENTES

La descripción inicial de la púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) en adultos fue hecha por Werlhof, quién en 1735 informó el caso de una mujer joven quién tuvo un cuadro de petequias, equimosis y hemorragia en mucosas, la cual presentó una recuperación clínica espontánea ⁽¹⁾. En los años '50, el término PTI se refería a una entidad clínica de etiología desconocida asociada a trombocitopenia y púrpura. En 1956 Harrington y cols. ⁽²⁾, sugirieron que la PTI, era una enfermedad inmunológica, basados en la observación de que la infusión de plasma de un paciente con la enfermedad, en individuos sanos era capaz de producir un descenso rápido en la cifra de plaquetas circulantes y que dicho efecto tenía una duración de 5 a 7 días. Shulman ⁽³⁾ al estudiar las características del factor responsable de la destrucción de las plaquetas, llegó a la conclusión que probablemente se trataba de un anticuerpo. Por otra parte Dixon y Ross ⁽⁴⁾, demostraron que muchos pacientes adultos con PTI crónica tenían elevadas las IgGs asociadas a las plaquetas (IgGAP) y los estudios en niños confirmaron la presencia de IgGAP en más de 85% de los pacientes. La IgGAP elevada mostraba una relación inversamente proporcional con la cifra de plaquetas pero no mostró capacidad predictiva respecto al curso de la enfermedad. Los hallazgos de van Leeuwen y cols. ⁽⁵⁾ en el sentido de que los anticuerpos antiplaquetarios generalmente no reaccionaban con plaquetas de individuos con Trombastenia de Glanzmann, sugerían que una gran parte de los

anticuerpos estaban dirigidos contra el complejo de Gp IIb-IIIa de las plaquetas, esto tuvo muchas implicaciones en el desarrollo de los métodos de estudio posteriores. Actualmente se sabe que los anticuerpos antiplaquetarios son globulinas séricas de clase IgG, IgM ó IgA que están dirigidos contra un determinante antigénico "blanco" de la membrana plaquetaria ⁽⁶⁾.

II GENERALIDADES

2.1 PURPURA TROMBOCITOPENICA IDIOPATICA (PTI)

Esta enfermedad también conocida como púrpura trombocitopénica inmunológica y púrpura trombocitopénica autoinmune, es una enfermedad hemorrágica adquirida con un curso generalmente benigno. La trombocitopenia que se presenta, en presencia de abundantes megacariocitos, sin evidencia de plaquetas en la médula ósea indican una salida activa de plaquetas a sangre periférica. En niños tiene buen pronóstico en contraste con los adolescentes y adultos en donde la mayoría desarrolla la forma crónica de la enfermedad ⁽⁷⁾.

2.2 INCIDENCIA

La incidencia en niños ha sido estimada entre 10 y 40 casos nuevos por 1 000 000 de personas por año en estudios realizados en Dinamarca ⁽⁸⁾ e Inglaterra ⁽⁹⁾, mientras que en Kuwait ha sido calculada en 125 por 1 000 000 de individuos ⁽¹⁰⁾. La incidencia de PTI en adultos es de aproximadamente 66 casos nuevos por 1 000 000 de individuos por año.

2.3 CARACTERISTICAS CLINICAS DE PTI EN NIÑOS Y ADULTOS

Los rasgos clínicos de la PTI son distintos entre niños y adultos; es característico en niños la aparición de una fase aguda que se resuelve espontáneamente a los 6 meses, mientras que la PTI del adulto tiene una aparición insidiosa y solo en raras ocasiones desaparece espontáneamente (Tabla 1).

Tabla 1
Manifestaciones clínicas de PTI en niños y adultos

| | Niños | Adultos |
|---|--|-------------------------------------|
| Incidencia | | |
| Edad (años) | 2 – 4 | 15-40 |
| Sexo (F:M) | Igual | 2.6: 1 |
| Presentación | | |
| Tipo | Agudo | Insidioso |
| Síntomas | (La mayoría con síntomas < 1 semana) (La mayoría con síntomas > de 2 meses) | |
| | Púrpura | Púrpura |
| | (< 10% con sangrado grave) | (Comúnmente sin sangrado grave) |
| Cuenta de plaquetas | La mayoría < 20x10 ⁹ /L | La mayoría < 20x10 ⁹ /L* |
| Curso | | |
| Remisión espontánea | 83% ^b | 2% ^c |
| Enfermedad crónica | 24% ^d | 43% ^d |
| Respuesta a esplenectomía | 71% ^e | 66% ^e |
| Recuperación completa | 89% ^f | 64% ^f |
| Morbilidad y mortalidad^g | | |
| Hemorragia cerebral | < 1% | 3% |
| Muerte por hemorragia | < 1% | 4% |
| Mortalidad de enfermedad refractaria | | |
| Crónica | 2% | 5% |

Notas:

- ^a La cuenta media de plaquetas al inicio en niños y adultos fue $< 20 \times 10^9/L$ y en adultos en algunas ocasiones se encontraron cifras de plaquetas $> 30 \times 10^9/L$.
- ^b La frecuencia de remisión espontánea en niños es sobrestimada debido a la selección de pacientes con PTI de corta duración y menos gravedad sin tratamiento.
- ^c La frecuencia de remisión espontánea en adultos puede ser subestimada debido a que la mayoría de los pacientes son tratados inicialmente con esteroides.
- ^d Enfermedad crónica en niños es definida como trombocitopenia persistente por mas de 6 meses y en raras ocasiones hasta 12 meses . En adultos, la enfermedad crónica es definida como la pérdida de una remisión completa permanente sin terapia, esteroides, esplenectomía u otro tipo de tratamiento.
- ^e La esplenectomía en niños fue realizada usualmente solo si la trombocitopenia sintomática persistía por mas de 1 año. Muchos adultos fueron esplenectomizados a los 6 meses del diagnóstico.
- ^f La recuperación completa es estrechamente dependiente de la duración del seguimiento. Picozzi VJ y cols. ⁽¹¹⁾ sugieren que este cuadro puede presentarse en 80% de los adultos cuando el seguimiento de la enfermedad se extiende de 5 a 20 años.
- ^g Esos datos son difíciles de aceptar. El pronóstico de PTI, claramente ha mejorado durante los pasados 50 años. El incremento en la morbilidad y en la mortalidad de los adultos refleja el curso de PTI mas largo, así como la mayor susceptibilidad de serias y fatales complicaciones en los adultos mayores de edad ⁽¹⁾.

2.4 ETIOLOGIA Y PATOGENESIS

2.4.1 PTI AGUDA

La forma aguda de PTI es mas común en niños entre las edades de 2 a 6 años y es usualmente precedida por una infección viral en un lapso de 1 – 6 semanas⁽¹¹⁾. En grandes series de PTI en niños, cerca del 80% tuvieron una historia de enfermedad viral como rubeola, varicela, infecciones respiratorias o vacunación con virus vivos 1 a 3 semanas antes de la aparición de los síntomas⁽¹²⁾. No hay predilección por el sexo. La IgGAP se encuentra elevada en todos los pacientes y si se comparan los grupos de PTI aguda y crónica, los valores tienden a ser mayores para una cuenta plaquetaria dada en los niños con PTI aguda⁽¹⁴⁾.

La observación de que el desarrollo de la PTI aguda sigue a una enfermedad viral, sugiere que el niño responde a los antígenos virales con producción de anticuerpos, formación de complejos inmunes y destrucción plaquetaria. La eliminación plaquetaria puede ser debida a la adsorción de los antígenos virales en la superficie plaquetaria seguida por la fijación de los anticuerpos o a la fijación de complejos inmunes vía el receptor Fc de las plaquetas.

2.4.2 PTI CRONICA

La trombocitopenia en pacientes con PTI crónica tiende a presentarse de manera insidiosa, las cuentas de plaquetas son extremadamente bajas($< 10 \times 10^9/L$) y el sangrado grave por

mucosas es poco frecuente. La enfermedad se ha visto mas comúnmente en mujeres y casi nunca remite espontáneamente ^(15, 16) . Una concentración elevada de IgGAP se ha encontrado en cerca de 90% de los pacientes y prácticamente en todos se presentan cuentas de plaquetas menores a $50 \times 10^9/L$.

La PTI crónica, es causada por anticuerpos circulantes reactivos en la membrana plaquetaria. Se debe específicamente a la unión de anticuerpos contra las glicoproteínas de la membrana plaquetaria, principalmente a la Gp IIb/IIIa ⁽¹⁷⁾ y/o a la Gp Ib/IX ⁽¹⁸⁾ y en forma menos común a la Gp Ia/IIa, Gp IV a la Gp Ib β . Así mismo se han demostrado anticuerpos contra otros constituyentes de la membrana como los glicoesfingolípidos ^(19,20) . La detección de Igs ligadas a la Gp IIb/IIIa y a la Gp Ib/IX es aproximadamente de 75% y en el plasma de los pacientes, en la mitad. En los niños, se encuentran las dos formas. Tsubakio P y cols. ⁽²¹⁾ , sugieren que los anticuerpos contra la Gp IIb/IIIa se unen a diferentes epítopes de la molécula. Por otra parte, Tomiyama y cols. ⁽²²⁾ , demostraron la presencia de anticuerpos contra varias proteínas plaquetarias, incluyendo la Ib, IIb y IIIa, de tal forma que estos estudios sugieren que los epítopes involucrados difieren entre los pacientes con PTI crónica . La alteración de la membrana plaquetaria causada por el complejo antígeno –anticuerpo expone a la plaqueta como "blanco" para la remoción rápida por las células del sistema reticuloendotelial (SRE), el cual es el paso final en la patogénesis de este síndrome ⁽²³⁾ .

2.5 CINETICA DE LAS PLAQUETAS

En general se acepta que la trombocitopenia es secundaria a la destrucción acelerada por fagocitosis, fundamentalmente en el bazo, de plaquetas unidas a anticuerpo. La

supervivencia plaquetaria está acortada marcadamente a menos de 10% de los 10 días normales de vida. Los megacariocitos se encuentran incrementados en número, volumen e inmadurez, las plaquetas están disminuidas en número pero incrementadas en volumen. Las plaquetas grandes o gigantes se observan rutinariamente en frotis de sangre con EDTA o con el volumen aumentado en el análisis del contador automático. El diámetro plaquetario medio es 1.6 veces mayor que el normal ⁽²⁴⁾. Branahog y Harker ^(25,26), estudiaron 49 pacientes con cuentas plaquetarias medias de $30 \times 10^9/L$ y la supervivencia plaquetaria fue de 0.34 y 0.67 días respectivamente.

2.6 ANTICUERPOS ANTIPLAQUETARIOS

Los estudios realizados en pacientes con PTI crónica muestran que las células esplénicas producen cantidades aumentadas de IgG *in vitro* y que una porción de esta IgG (0.5 a 3%) es plaqueta específica. Estudios cuantitativos muestran que el bazo en PTI produce suficiente IgG plaqueta-específica para saturar completamente los sitios antigénicos de las plaquetas (cerca de 5 000 sitios/plaqueta), hasta en dos a tres veces el número de plaquetas producidas normalmente cada día ⁽²⁷⁾. Estudios *in vitro* indican que los anticuerpos antiplaquetas también son producidos por células de la médula ósea de pacientes con PTI crónica y se sugiere que en pacientes que no responden a la esplenectomía, la médula ósea es el sitio principal de producción de anticuerpos ⁽²⁸⁾. El análisis con inmunofluorescencia muestra que 95% de los pacientes con PTI crónica tienen anticuerpos antiplaquetarios IgG o

en combinación con IgA o IgM. En 5% de los pacientes solo se observaron anticuerpos IgM
(29)

2.7 MECANISMO DE DESTRUCCION DE LAS PLAQUETAS POR RESPUESTA INMUNE.

La secuencia de destrucción patológica plaquetaria en PTI crónica, se muestra en la Figura 1, la respuesta inicial de producción de anticuerpos probablemente se desarrolla en el bazo, puesto que este órgano es el primero en responder a la inyección intravenosa de antígeno; así también es el sitio principal de producción de anticuerpos antiplaquetarios en PTI crónica. En algunos pacientes puede ser el único sitio de producción debido a la restauración de la función normal de la cinética plaquetaria en algunos individuos después de la esplenectomía. Mientras que la trombocitopenia y la concentración aumentada de IgGAP pueden persistir después de la esplenectomía, posiblemente porque en otros sitios como la médula ósea puede continuar la producción de anticuerpos. La causa de la producción de anticuerpos antiplaquetarios en PTI crónica es desconocida.

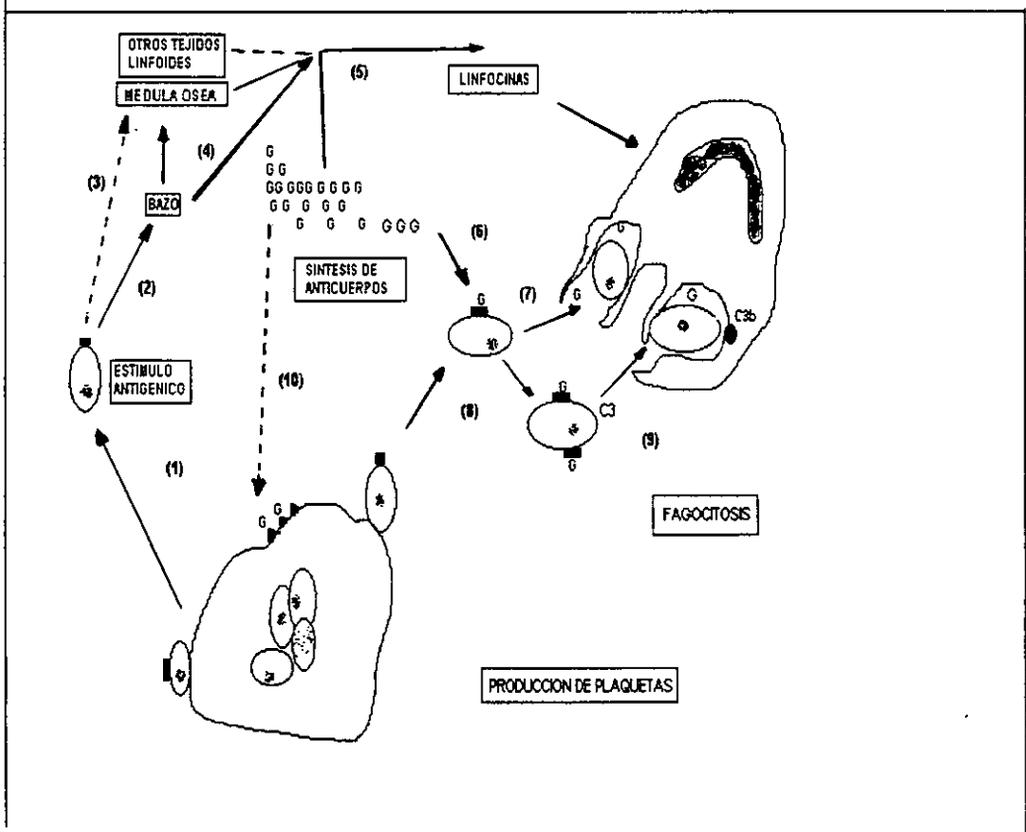
En la regulación inmune, están asociadas 2 tipos de células timo-dependientes, funcional y antigénicamente distintas: células T inductoras (cooperadoras), las cuales estimulan la proliferación y maduración de las células B hasta células plasmáticas productoras de anticuerpos y las células T supresoras⁽³⁰⁾. Los linfocitos B autorreactivos secretan anticuerpos antiplaquetas y este evento es considerado el primer defecto inmunológico. Las enfermedades autoinmunes probablemente son el resultado del descontrol de los mecanismos involucrados en la respuesta del organismo a sus "propios" antígenos. Este tipo

de padecimientos pueden resultar de células T inductoras con actividad anormal o deficientes, así como de células T supresoras defectuosas . Se han demostrado reacciones citotóxicas mediadas por células contra las plaquetas y se han informado cifras disminuídas de CD4 e incrementada la proporción CD4/CD8 ^(31,32) .

La destrucción plaquetaria en PTI es el resultado de la unión antígeno-anticuerpo con o sin activación del complemento, seguida de fagocitosis, ésta puede llevarse a cabo por medio de la fracción Fc de la molécula de IgG ligada (IgG1 e IgG3, son las más activas), o por fijación de C3b a la superficie de la célula, resultado de la activación del complemento. En pacientes con PTI se han demostrado concentraciones elevadas de IgGAP y éstas son inversamente correlacionadas con la gravedad de la enfermedad y la supervivencia intravascular de las plaquetas ⁽³³⁾ . La inhibición de la destrucción plaquetaria en pacientes con PTI por infusiones de gammaglobulina intravenosa muestra que este mecanismo es el "primario" ⁽³⁴⁾ . El papel de la fijación de C3b en PTI es desconocido pero se supone puede ser importante en algunos pacientes.

FIGURA 1

Mecanismo de destrucción de las plaquetas debido a la respuesta inmune



1.- Se produce un antígeno asociado a la plaqueta (■). El antígeno puede ser un autoantígeno plaquetario o una molécula nativa débilmente adherente o extraña.

2.- Dado que la plaqueta está en forma intravascular, la estimulación antigénica inicial a la proliferación linfocítica se produce en el bazo.

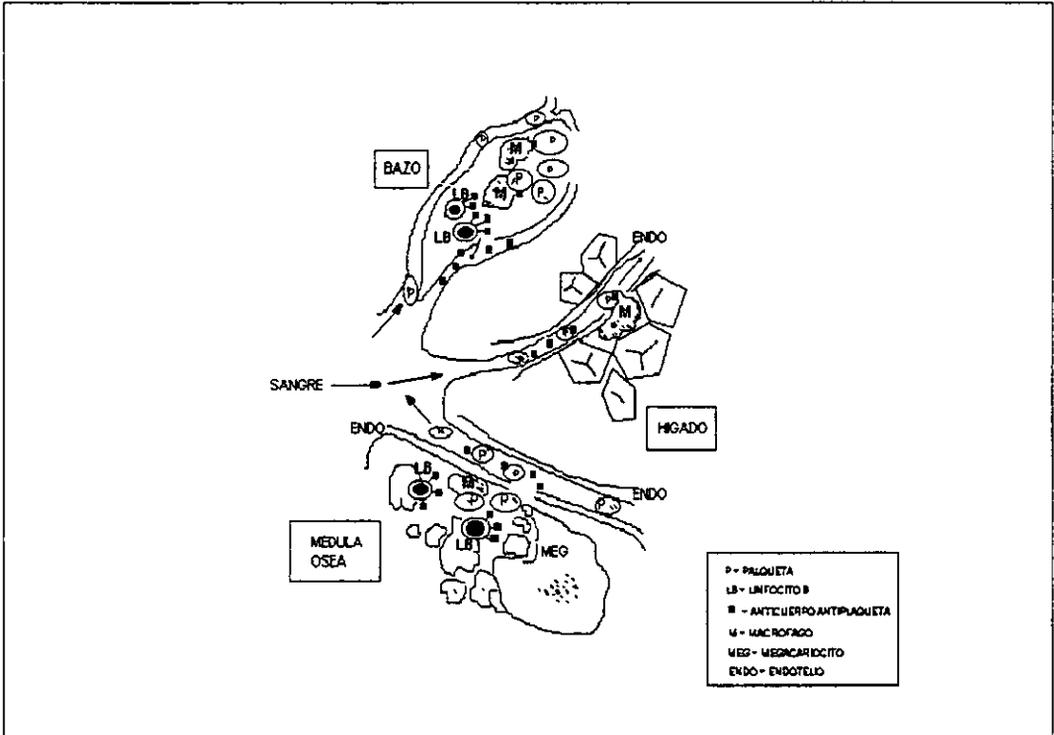
- 3.- Probablemente en cierta cantidad en la médula ósea.
- 4.- Con el tiempo se producen células de memoria antígeno específicas, éstas circulan y permiten una respuesta inmune mas generalizada.
- 5.- La síntesis de anticuerpos antiplaquetas ocurre inicialmente en el bazo y mas tarde en médula ósea y posiblemente en otros tejidos linfoides.
- 6.- El anticuerpo antiplaquetario IgG (G) se une al antígeno asociado a la plaqueta.
- 7.- Dando como resultado fagocitosis por medio del receptor Fc del macrófago.
- 8.- La unión de 2 moléculas de IgG permite activación del complemento con fijación de C3b en la superficie de la plaqueta.
- 9.- Este proceso permite fagocitosis mas eficiente a través de los receptores Fc y C3b de los macrófagos .
- 10.- Además, el anticuerpo antiplaquetario en algunos casos se fija al megacariocito ⁽³⁵⁾ .

2.8 SITIOS DE DESTRUCCION EN PTI CRONICA

Muchos factores contribuyen a la importancia de un órgano en la destrucción plaquetaria, incluyendo la producción de antígenos locales, la presencia de un fondo común de plaquetas, un SRE activo y la velocidad del flujo sanguíneo a través del órgano. La comparación de los factores que contribuyen en los 3 órganos que más pueden estar involucrados en la destrucción de las plaquetas en PTI se muestran en la Figura 2. El bazo es indudablemente el sitio mas importante de destrucción en la mayoría de los pacientes con PTI y bajo ciertas circunstancias se ven involucrados la médula ósea y el hígado.

FIGURA 2

Sitios de destrucción en PTI crónica



1.- El bazo es el sitio de destrucción primaria en la mayoría de los casos. Tiene un gran fondo común de plaquetas (aproximadamente 30% de las plaquetas de la masa circulante). Existe síntesis *in situ* de grandes cantidades de anticuerpos antiplaquetarios, un SRE activo y una circulación lenta que permite un tiempo prolongado para incubación de los reactantes.

2.- El hígado es importante en algunos pacientes con PTI grave. No contiene un fondo común de plaquetas, secreta una pequeña cantidad o ninguna de anticuerpos antiplaquetarios y tiene en promedio una circulación aunque intermitente, mas rápida. Sin embargo el SRE activo puede fagocitar plaquetas bajo estas condiciones subóptimas si éstas están muy sensibilizadas. Dado que este órgano filtra una mayor proporción de volumen sanguíneo que otros órganos del SRE, se vuelve de suma importancia cuando los títulos de anticuerpos antiplaquetarios son bajos.

3.- La médula ósea en algunos pacientes con PTI contienen un medio ambiente destructivo similar al del bazo y es muy probable que la destrucción intramedular sea importante en algunos pacientes con PTI.

III METODOS DE ESTUDIO

3.1 ANTECEDENTES

Las pruebas iniciales para detectar anticuerpos antiplaquetarios se basaron en medir el efecto del plasma del paciente sobre la función de las plaquetas normales, tales como inducción de agregación, secreción o lisis plaquetaria. Los métodos fueron de baja sensibilidad para detectar anomalías en PTI. Cuando se desarrollaron pruebas cuantitativas de IgG en plaquetas, se encontraron valores altos en pacientes con PTI por tanto, se dedujo que toda la IgG plaquetaria que fuera localizada sobre la superficie de la plaqueta era anticuerpo antiplaquetario. Esa aseveración fue imprecisa y subsecuentemente causó muchas dificultades de interpretación. Las plaquetas normales contienen 2 depósitos distintos de IgG, la de la superficie y la intracelular. Sólo cerca de 100 moléculas de IgG están sobre la superficie, mientras los gránulos α contienen cerca de 20,000 moléculas de IgG. Las pruebas para la detección de IgG plaquetaria fueron divididas en 2 categorías: aquellas que miden el contenido de IgG plaquetaria total (principalmente la de los gránulos α) y aquellas que miden solamente moléculas de IgG sobre la superficie de las plaquetas. Los métodos usados en las pruebas originales para detectar IgG plaquetaria miden IgG total, debido a la lisis plaquetaria no intencional y secreción de los gránulos α , por tanto esos datos fueron descritos en forma imprecisa como IgG de la superficie de la plaqueta. Posteriormente surgieron nuevas técnicas para medir anticuerpos presentes en el suero o sobre glicoproteínas de la membrana plaquetaria, evitando algunos de los problemas

presentados por las técnicas previas ⁽¹⁾. A continuación se mencionan las diferentes metodologías en secuencia cronológica (Tabla 2).

Tabla 2 ⁽³⁶⁾

Métodos para la detección de anticuerpos antiplaquetarios

| | Referencia |
|--|----------------|
| Técnicas basadas en la activación plaquetaria | |
| • Acúmulos de plaquetas | (37) |
| • Factor 3 plaquetario | (39) |
| • Agregación plaquetaria | (42) |
| • Producción de serotonina | (44) |
| Métodos inmunológicos | |
| • Consumo de IgG antihumana | (45) |
| • Consumo de la fracción Fab de la IgG antihumana | (46) |
| • IgG antihumana I ¹²⁵ | (43) (47) (48) |
| • C3 antihumano I ¹²⁵ | (49) |
| • Proteína A del estafilococo-I ¹²⁵ | (50) |
| • ELISA | (52) (53) (54) |
| • Inmunofluorescencia | (55) (56) |

3.2 TECNICAS BASADAS EN ACTIVACION PLAQUETARIA

Las técnicas de plaquetas agrupadas y de agregación plaquetaria, como las que desarrollaron Coombs y Bedford ⁽³⁷⁾ demostraron la presencia de grupos sanguíneos A y B en las plaquetas. Otros investigadores como Horwitz ⁽³⁸⁾ y Karpatkin ⁽³⁹⁾, usaron Factor 3 plaquetario como indicador de reacciones inmunes involucradas en las plaquetas. En éste tipo de prueba hubo dificultad en reproducción y estandarización de la misma. Pogliani ⁽⁴⁰⁾, Dykin y Helerstein ⁽⁴¹⁾ utilizaron agregometría plaquetaria para detectar aloanticuerpos, técnica que no fue de utilidad en PTI. Basados en que las plaquetas activadas producen nucleótidos como serotonina y adenina, ambos se utilizaron para detectar anticuerpos antiplaquetas en plaquetas estimuladas como en los métodos desarrollados por Bridges ⁽⁴²⁾, Hirshman y Shulman ⁽⁴⁴⁾, sin embargo carecieron de sensibilidad en PTI.

3.3 PRUEBAS INMUNOLOGICAS

Se han utilizado anticuerpos específicos contra los factores implicados en la destrucción plaquetaria como son la IgGAP, IgM-asociada a plaquetas (IgMAP) e IgA-asociada a plaquetas (IgAAP) o complemento. Si se emplean anticuerpos secundarios con radioactividad(¹²⁵I), marcados con fluoresceína o acoplados a una enzima (ELISA), la cantidad de anticuerpo unido a las plaquetas puede medirse directamente. En teoría estos métodos de reconocimiento inmunológico y no sobre activación de las plaquetas resultaron

ser más específicos. Se han probado una gran cantidad de métodos ⁽³⁶⁾ para la cuantificación de IgGAP, expresando los resultados como moléculas de IgG por plaqueta, sin embargo debido a la inherente variabilidad con respecto a la concentración relativa, así como también a la actividad de unión de los anticuerpos primario y secundario, se produjeron resultados no comparables en diferentes laboratorios. Dixon y cols. ⁽⁴⁵⁾, por medio del método basado en el consumo de anticuerpo-antihumano, midieron IgG antihumana residual no unida a las plaquetas, después que éstas fueron incubadas con IgG antihumana. La IgG antihumana no unida fue cuantificada por medio de la cantidad de lisis de los glóbulos rojos cubiertos con complemento. La cantidad de IgGAP fue inversamente proporcional con la cifra de plaquetas del paciente, no obstante subsecuentes publicaciones mostraron cantidades de IgGAP mas altas que las encontradas por estos autores. McMillan ⁽⁴⁶⁾, utilizó el fragmento Fab de la molécula de IgG antihumana, anti Fab con radioactividad I^{125} , para cuantificar IgGAP. Después de incubar el fragmento Fab con las plaquetas, la molécula anti-Fab no unida fue detectada por medio de Fab- I^{125} en solución y el complejo antígeno-anticuerpo se sometió a precipitación. La cantidad encontrada fue relacionada con una curva de calibración. Por este método se estudiaron 19 adultos y 12 niños con PTI crónica y 6 niños con PTI aguda y todos tuvieron elevada la IgGAP. Se demostró una relación inversa entre la cifra de plaquetas y la cantidad de IgGAP. Como originalmente se describió, el proceso de la técnica duraba varios días y no fue recomendada para uso de rutina. Soulier ⁽⁴⁷⁾ usó IgG de camero antihumana marcada con I^{125} purificada por columna de afinidad para detectar trombocitopenia neonatal isoimmune, pero la prueba no fue sensible en pacientes con PTI. Por otro lado, LoBuglio ⁽⁴⁸⁾ considerando que una molécula de IgGAP (anticuerpo primario) se unía a una molécula de

anticuerpo monoclonal IgG antihumano- I^{125} (anticuerpo secundario), específico para la región Fc, cuantificó el incremento de IgGAP de esta manera sin embargo, la cifra de referencia fue menor por un factor de 10 – 100 veces a lo previamente encontrado por Shwartz ⁽³⁶⁾ quién también utilizó un anticuerpo monoclonal antihumano- I^{125} , pero con las condiciones del ensayo diferentes en las medidas directas, debido a que la proporción de anticuerpo primario y secundario fue de 1.0 y no de 0.35. Por otro lado, considerando que la proteína A del estafilococo (PAS) se une a la fracción Fc de la IgG humana y que ésta puede ser marcada con radioactividad y substituida por anticuerpos antihumanos purificados utilizados en las pruebas para detección de IgGAP, Shaw ⁽⁵⁰⁾, mostró resultados positivos en pacientes con PTI. La PAS purificada tiene la ventaja que se pueda adquirir en forma comercial, pero se considera una desventaja al no unirse a IgG de clase 3, puesto que Hymes y cols. ⁽⁵¹⁾, demostraron anteriormente que todas las subclases son reconocidas como IgAP.

3.4 METODO DE INMUNOENSAYO ENZIMATICO (ELISA)

La metodología de ELISA ha sido utilizada para detectar anticuerpos asociados a la plaqueta así como para complemento. El fundamento de estas pruebas es similar a aquellas descritas anteriormente, con excepción que el anticuerpo secundario es acoplado a una enzima marcada con I^{125} . Cuando se mezcla con el sustrato apropiado, el anticuerpo marcado con la enzima desarrolla un color que puede ser cuantificado espectrofotométricamente. Por medio de este método es posible detectar IgG, IgA, IgM, C3, C4, y subclases de IgG

antiplaquetarias. Diversos autores ^(52,53) , utilizaron esta técnica que tiempo después resultó no ser reproducible.

3.5 INMUNOFLUORESCENCIA

Los anticuerpos marcados con fluoresceína también se han utilizado para detectar IgG, IgA e IgM, subclases de IgG y anticuerpos contra complemento en las plaquetas de los pacientes con PTI. Von Dem Borne y cols. ⁽⁵⁴⁾ solucionaron el problema de la fluorescencia no específica por fijación de las plaquetas con paraformaldehído. Anderson y cols. ⁽⁵⁵⁾ , almacenaron en congelación, plaquetas fijadas con paraformaldehído, por un año sin pérdida de sensibilidad. Surgiura y cols. ⁽⁵⁶⁾ , desarrollaron una prueba fluorescente cuantitativa, sugirieron la concentración de anticuerpo y la proporción adecuada entre los anticuerpos primario y secundario para calcular la cantidad de IgGAP.

3.5.1 CITOMETRIA DE FLUJO

La citometría de flujo (CF), se ha adaptado para medir IgGAP , IgMAP e IgAAP con Igs marcadas con un fluorocromo. Por medio de este método, se cuantifica la fluorescencia de las plaquetas incubadas con un anticuerpo monoclonal IgG, IgM e IgA – antihumano (obtenido en ratón o conejo), unido a otro anticuerpo anti-ratón o conejo (obtenido en cabra) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Los resultados se expresan como cantidad de fluorescencia en por ciento o como fluorescencia relativa (proporción de fluorescencia específica y la fluorescencia no específica).

IV CITOMETRIA DE FLUJO

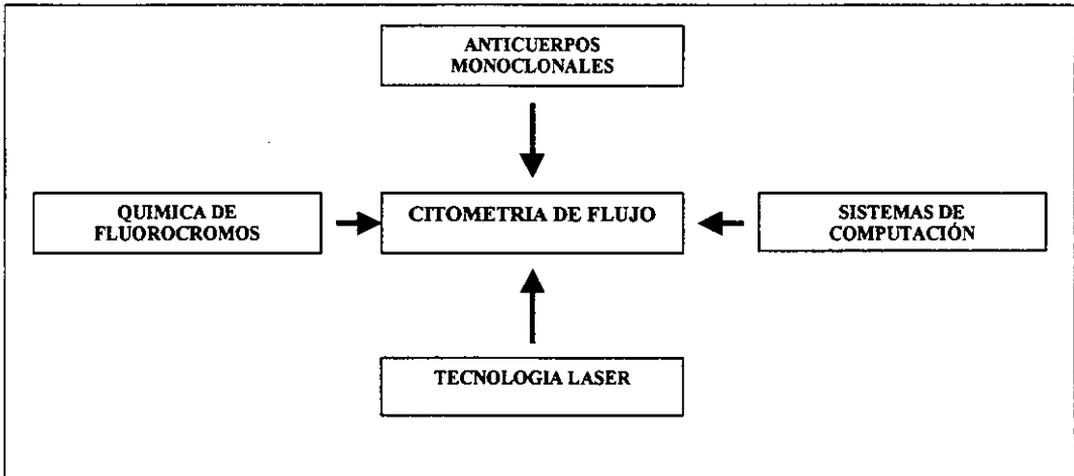
La CF es un método que se puede definir como la medición objetiva de las características fisicoquímicas específicas de células o tejidos al paso a través de detectores, en una forma electrónica automatizada (en un citómetro de flujo), multiparamétrica, mientras son iluminados por la luz intensa de un rayo laser.

4.1 FUNDAMENTO

Los principios básicos de la CF no son nuevos. La CF es una metodología que combina diversas tecnologías ⁽⁵⁷⁾ como son: 1) instrumentación citométrica. Desde hace 30 años se introdujo el concepto de volumen celular electrónico en el primer contador de células (Coulter). En las células suspendidas en un fluido, se realizaron medidas electrónicas en cada una de las mismas al tiempo de pasar por el punto de medida. 2) Procesos computacionales. Avances en computación y electrónica en relación al campo de la citología llevó a la metodología a un mejor nivel. 3) Producción y disponibilidad de anticuerpos monoclonales. Un mayor conocimiento del sistema inmune, combinado con la disponibilidad de anticuerpos monoclonales producidos por la tecnología de los hibridomas favoreció que la CF fuera aplicable clínicamente. 4) Química de los fluorocromos. En la actualidad existe una gran cantidad de sustancias químicas fluorescentes, lo que le confiere a esta metodología grandes ventajas, Figura 3.

Figura 3

Tecnologías relacionadas en la CF



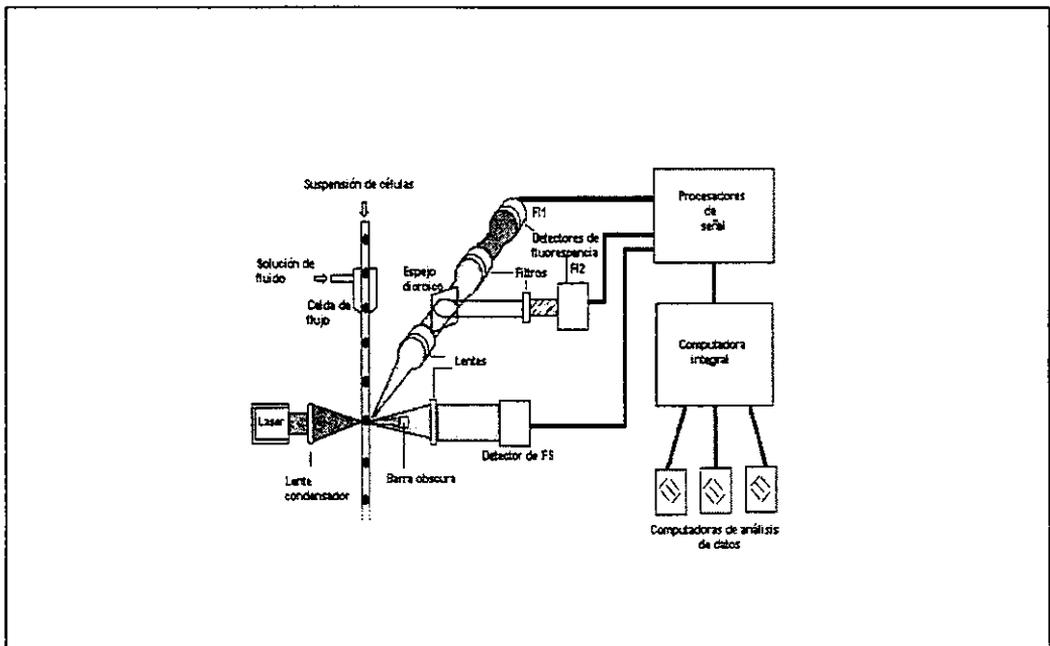
4.2 CITOMETRO DE FLUJO

El citómetro de flujo esta compuesto por 4 sistemas principales:

- Fuente de luz. Usualmente un rayo laser.
- Cámara de muestra y ensamblaje óptico.
- Un grupo de dispositivos electrónicos que convierten los impulsos de luz a señales digitales.
- Un sistema de computación que controla las operaciones del instrumento, colección de datos y procesos analíticos de rutina.

La estructura interna del citómetro se esquematiza en la Figura 4. Se puede observar la configuración ortogonal en lo que respecta a los tres ejes principales del instrumento: el flujo de la muestra, la fuente luminosa y el eje de colección y detección de las emisiones fluorescentes.

FIGURA 4
Estructura interna del citómetro de flujo



4.3 OPERACION

Durante la operación, las partículas a analizar son introducidas en el compartimento de fluidos con una solución isotónica, la cual es sometida a presión a través de una cámara en forma de "V", esta solución sale por un orificio que generalmente es de 50 a 76 μm de diámetro y la velocidad de salida es de aproximadamente de 10 m/seg. ⁽⁵⁸⁾. La cámara V crea geoméricamente un flujo laminar desde el tubo de toma de la muestra. La muestra en suspensión monodispersa es presurizada a una mayor presión diferencial que la solución de flujo y es introducida a la cámara manteniéndose en medio de la corriente del líquido. La solución de fluido en la cámara crea un efecto hidrodinámico que conduce a las células, rodeadas de líquido hacia el rayo laser inmediatamente después de salir de la cámara. La fuente de luz habitualmente es un laser de argón (488 nm), algunas ocasiones se utilizan de mercurio, helio criptón, etc. El laser opera en un rango de 50 mv a 5 wats de potencia y tiene la ventaja de producir un potente rayo de luz monocromática la que puede ser dirigida en forma de diversas longitudes de onda. Si las células por analizar contienen fluorocromos sobre su superficie, citoplasma o núcleo, se producen principalmente 2 eventos: primero, la luz de la fuente es dispersada por la célula, en ángulo de 360° o cercano a 0° y la cantidad de luz en dirección frontal a lo largo del eje del laser es proporcional al tamaño de la célula. La magnitud de este parámetro es conocida como dispersión frontal de la luz (FS: Forward Scatter). Al mismo tiempo la luz es colectada en forma ortogonal al eje del rayo, es el producto de muchas interacciones complejas con la célula que generalmente indica granularidad o textura celular. Esta es llamada dispersión lateral a 90° (SS: Side Scatter).

Refleja la estructura interna de la célula, en consecuencia los linfocitos tienen baja SS, los granulocitos alta y los monocitos intermedia. La combinación de FS y SS ofrece mayor resolución que cada parámetro en forma aislada. El segundo evento, es la producción de fluorescencia, esto sucede cuando una célula conteniendo un fluorocromo absorbe la luz laser a la longitud de onda incidente y la emite a una longitud de onda mayor. El fenómeno ocurre rápidamente (10^{-5} seg.); la luz emitida es de baja energía y así de diferente color. Pueden estar presentes varios fluorocromos en la célula y ser detectados. La emisión multicolorada es dirigida a través de una serie de filtros ópticos selectivos y cada longitud de onda llega a un detector diferente, la emisión de los diversos fluorocromos es cuantificada separadamente. Los fotones de luz se dirigen a los detectores y en los tubos fotomultiplicadores son convertidos a pulsos electrónicos (señal analógica). Mientras mayor es la cantidad de luz emitida, mayor será el pulso eléctrico. Esta señal es procesada por un convertidor analógico-digital el cual transforma el pulso analógico a una señal digital: un número. Los números son registrados por el sistema de la computadora como datos (puntos) en una gráfica de distribución de frecuencia o histograma con mas de 1023 canales de resolución. Uno de los aspectos mas importantes es que la CF proporciona un análisis multiparamétrico, con la obtención de mediciones basadas sobre el análisis de una población completa de células, representativa de los atributos de cada uno de los miembros de la población. Para aumentar las ventajas del análisis es posible realizar "mapas" o "ventanas" electrónicas (gate), que representan el aislamiento del área (población particular) de interés. La computadora es programada para coleccionar los datos indicados sobre las células del interior del mapa electrónico. El instrumento tiene una sensibilidad de detección de hasta 2 000

moléculas de fluorocromo, en este caso la emisión puede ser amplificada en una escala logarítmica.

V ANALISIS ESTADISTICO

5.1 METODO ESTADISTICO

Para el análisis estadístico de los resultados, es aplicable la **prueba de sensibilidad y especificidad clínicas** ⁽⁵⁹⁾. Se define como sensibilidad a la frecuencia con que es positivo un examen en sujetos afectados por la alteración que se pretende detectar, e inespecífica a la frecuencia de positividad de aquellos sujetos que están libres del padecimiento. Así un examen ideal es aquel que tiene sensibilidad de 100% e inespecificidad de 0%, es decir que se encuentra positivo (fuera de los "límites de referencia") en todos los sujetos enfermos y negativo (dentro de los "límites de referencia") en los individuos en quienes el padecimiento en cuestión no existe.

Los límites de referencia del presente estudio se obtuvieron aplicando 2DE a la media obtenida en el grupo de controles sanos. El procedimiento de cálculo de la sensibilidad y la especificidad se indica a continuación:

| Resultado de la prueba | Condición confirmada | |
|------------------------|----------------------|----------|
| | Positiva | Negativa |
| Positivo | a | b |
| Negativo | c | d |

Cálculo de la sensibilidad:

$$S = \frac{a}{a + c}$$

y la especificidad:

$$e = \frac{d}{b + d}$$

5.2 VALORES PREDICTIVOS

En el trabajo actual, se partió de la base que en los individuos la condición de PTI fue confirmada, por tanto es necesario conocer si la prueba resulta de utilidad en pacientes en quienes el diagnóstico es desconocido. Se calcularon los valores positivo y negativo de la forma siguiente:

$$\begin{array}{cc} \text{Valor predictivo} = \frac{a}{a + b} & \text{Valor predictivo} = \frac{d}{c + d} \\ \text{positivo} & \text{negativo} \end{array}$$

5.3 PROBABILIDAD EXACTA DE FISHER Y YATES ⁽⁶⁰⁾

Es un procedimiento eficaz en la escala nominal con dos muestras independientes. La razón de esto se basa en que se calcula directamente la probabilidad de una serie de arreglos de frecuencias observadas en una tabla de contingencia de 2 x 2, dada en una distribución hipergeométrica. Para calcularla se deben seguir los pasos del algoritmo.

Algoritmo:

Tabla de contingencia 2 x 2:

| | + | - |
|------------|---|---|
| Muestra I | A | B |
| Muestra II | C | D |



Obtención de los totales de las hileras (A+B) y (C+D) y de las columnas (A+C) y (B+D), así como el gran total (N).



Obtener los valores factoriales de los totales de hileras y columnas y después multiplicarlos

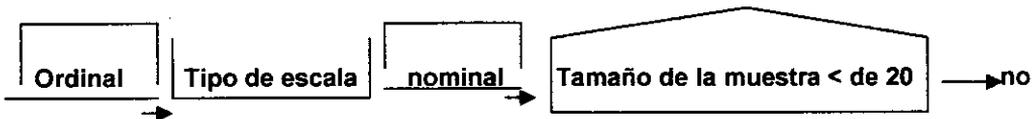
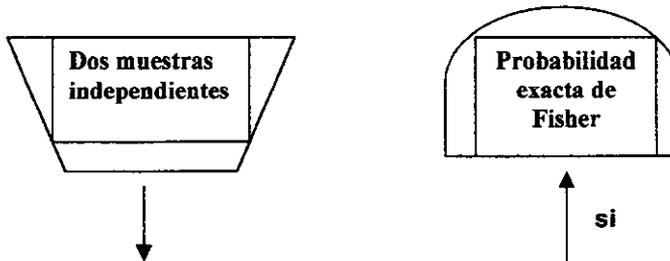


Calcular los factoriales del gran total y multiplicar éste por todos los factoriales entre el segundo. Este resultado es la probabilidad exacta de Fisher y Yates

La fórmula para calcular la probabilidad de Fisher y Yates es la siguiente:

$$p = \frac{(A+B)! \times (C+D)!}{A! B! C! D! \times N!}$$

El nivel de significancia es dependiente de si es > ó < de 0.05 y de esto depende si se aceptan o rechazan las hipótesis.



VI OBJETIVO

El objetivo del presente estudio fue evaluar la utilidad clínica de la citometría de flujo en la detección de IgG e IgM ligadas a la superficie de las plaquetas en un grupo de niños y adultos con PTI atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría y del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".

VII MATERIAL Y METODOS

7.1 MATERIAL

El estudio se llevó a cabo en pacientes pediátricos provenientes del Instituto Nacional de Pediatría y en adultos del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán". Se estudiaron 41 niños y 21 adultos con trombocitopenia inmunológica de los que en 57 se estableció el diagnóstico de PTI, en 4 de lupus eritematoso sistémico (LES) y en un paciente el de síndrome de antifosfolípidos primario (SAFP). Además, se estudiaron 26 niños y 29 adultos con trombocitopenia no inmunológica. El diagnóstico de PTI se integró mediante una cuenta baja de plaquetas ($> 10 \times 10^9/L$) una médula ósea esencialmente normal y ausencia de evidencia de otra enfermedad. Los pacientes con lupus eritematoso sistémico cumplían con los criterios diagnósticos de la Asociación Americana de Reumatismo⁽⁶¹⁾ y el diagnóstico del paciente con síndrome primario de antifosfolípidos se basó según el criterio de León y cols.⁽⁶²⁾. La edad en los niños con PTI osciló entre 2 meses y 16 años (mediana 5.9 años) y en los adultos entre 17 y 64 años (mediana 45 años). Todos los pacientes adultos con PTI tenían la forma crónica, mientras que de los niños, 17 correspondieron a PTI aguda y 22 a PTI crónica. Los diagnósticos del grupo de pacientes con trombocitopenia no inmunológica se muestran en la Tabla 3. Para obtener la "cifras de referencia de IgAP" se incluyó un grupo de 30 donadores de sangre aparentemente sanos, con cuenta de plaquetas $>200 \times 10^9/L$.

7.2 METODO ^(57,63)

7.2.1 MUESTRA

Para la obtención de un número adecuado de plaquetas se colectaron: 10 mL de sangre anticoagulada con EDTA si la cuenta era de $< 10 \times 10^9/L$, y 5 mL de sangre si la cuenta era $> 10 \times 10^9/L$.

7.2.2 REACTIVOS

- Amortiguador de fosfatos salinos (PBS) adicionado de etilén diamino tetracético disódico (PBS-EDTA). PBS-EDTA: Na_2EDTA 0.009 mol/L; Na_2HPO_4 0.01 mol/L; KH_2PO_4 0.0018 mol/L; NaCl 0.17 mol/L y KCl 0.0033 mol/L.
- Albúmina sérica bovina al 5%. Pesar 500 mg de albúmina y aforar a 10 mL con agua desionizada.
- Paraformaldehído al 2%. Pesar 1g de paraformaldehído y adicionar 25 mL de PBS-EDTA. Incubar toda la noche a 37°C . Aforar a 50 mL con PBS-EDTA.
- Anticuerpos monoclonales: fragmento F(ab)_2 de la IgG
fragmento F(ab)_2 de la IgM
CD41 (GpIIb/IIIa)
de conejo antihumano conjugados con isotiocianato de fluoresceína
Control de isoptipo IgG_{2a}
de cabra anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína

7.2.3 PROCEDIMIENTO

- 1- Tomar sangre periférica del paciente de acuerdo a la cuenta plaquetaria
Procesar las muestras en las 36 horas posteriores a la toma de la misma.
- 2- Centrifugar la sangre durante 10 min a 1 000 rpm (200 g) y 20°C .
- 3- Separar el plasma rico en plaquetas y centrifugar a 2 000 rpm (800 g) durante 10 min a 20°C.
- 4- Lavar el botón plaquetario 1x con 3.5 mL de amortiguador PBS-EDTA, centrifugando a 2 000 rpm durante 5 min.
- 5- Resuspender el botón de plaquetas en 1 mL de paraformaldehído al 2% en PBS-EDTA. Incubar a TA durante 15 min
- 6- Agregar 2.5 mL de PBS-EDTA y centrifugar a 2 000 rpm por 5 min.
- 7- Lavar con 3.5 mL de PBS-EDTA.
- 8- En base a la cuenta plaquetaria obtenida en la sangre total, ajustar la concentración de plaquetas a 5×10^6 /mL.
- 9- Recubrir 4 tubos de 12x75 mm de propileno con 30 μ L de albúmina sérica bobina al 5% y colocar en cada uno de ellos 10 mL de cada uno de los anticuerpos monoclonales, así como el control isotipo.
- 10- Adicionar a cada uno de los cuatro tubos 200 μ L de la suspensión de plaquetas ajustadas a 5×10^6 /mL.
- 11- Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente durante 30 min.
- 12- Lavar 2x con 2 mL de PBS-EDTA centrifugando durante 5 min a 2 000 rpm.

- 13- Resuspender el botón de plaquetas en 1 mL de PBS-EDTA.
- 14- Analizar la fluorescencia unida a las plaquetas en un citómetro de flujo. Establecer la fluorescencia inespecífica con el control de isotipo e identificar la población de plaquetas CD41 positivas. Determinar el porcentaje de plaquetas con IgG y/o IgM adheridas a su superficie.

7.2.4. CONDICIONES Y OPERACION DEL CITOMETRO DE FLUJO

En el presente estudio, las plaquetas fueron analizadas para la detección de IgGs en un citómetro de flujo Cytoron Absolute (Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ). Las condiciones en que operó fueron: potencia de 1 wat; rayo laser de argón 488 nm. Para el análisis fue creado un histograma de dispersión frontal (FS) en el eje Y vs dispersión lateral (SS) en el eje X, ambos en escala logarítmica. Aquí se definió el mapa electrónico (gate) para delimitar el área de las plaquetas, Figura 5. La fluorescencia inespecífica se estableció por medio del control de isotipo, Figura 6 , se comprobó que la población aislada expresara el CD41+, Figura 7 y la cantidad de fluorescencia positiva se midió en un histograma de un parámetro, programado previamente para registrar cuenta vs fluorescencia, Figura 8. El análisis se realizó en aproximadamente 20 000 plaquetas en cada ensayo.

FIGURA 5

FS vs SS

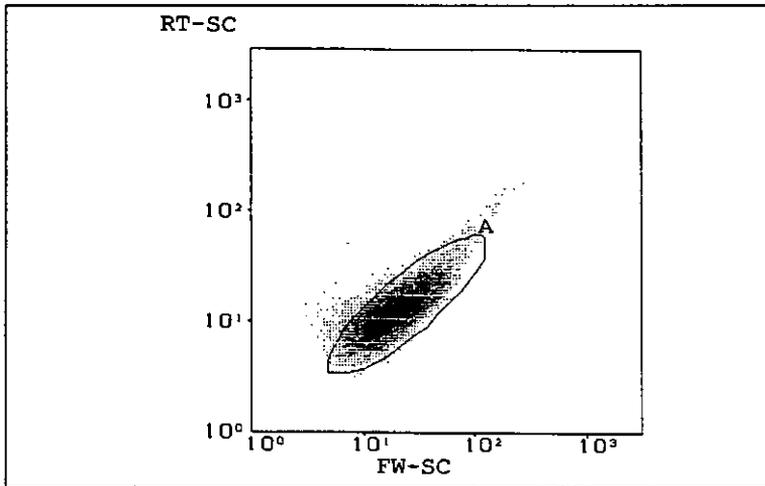


FIGURA 6

Control Isotipo

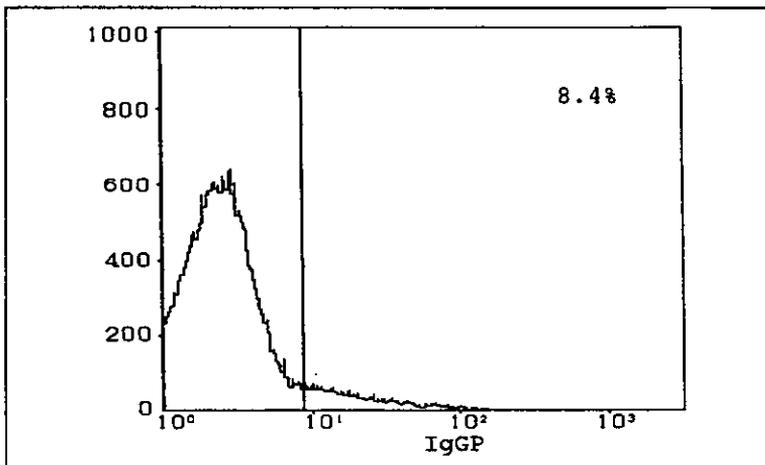


FIGURA 7

CD41

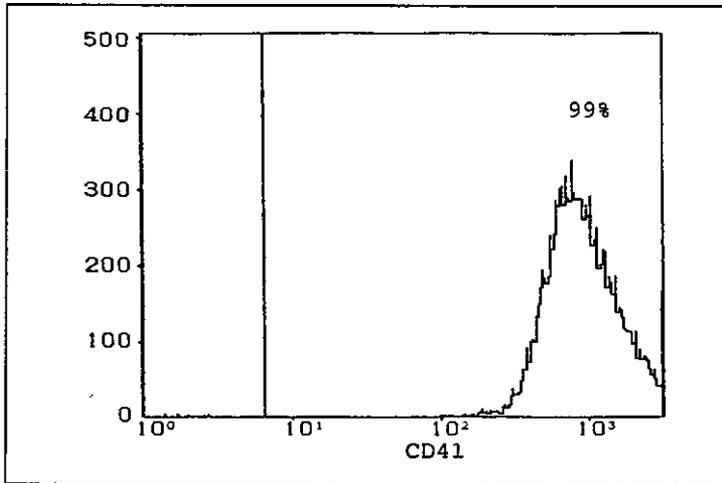
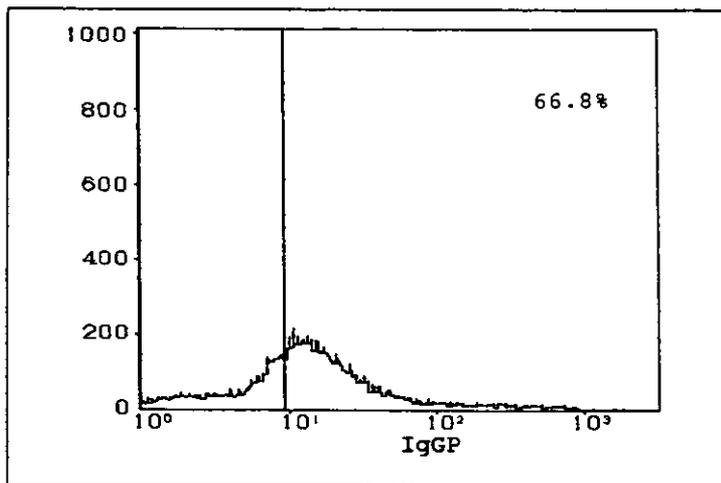


FIGURA 8

Cuenta vs F11



VIII RESULTADOS

8.1 CIFRAS DE REFERENCIA

El porcentaje de plaquetas con anticuerpos anti IgG en los donadores osciló de 1.5 a 18.3 (media = 8.5 %; DE = 4.1), y con anticuerpos anti IgM entre 0.3 y 14.6 (media = 6.5; DE = 3.6). La prueba se consideró positiva cuando los anticuerpos anti IgG fueron > 16,8% y anti IgM > 13,8%. En las Figuras 9 y 10 se muestran los valores individuales del porcentaje de plaquetas con anticuerpos IgG e IgM en niños y en adultos respectivamente. Como puede apreciarse en la Figura 9 , se obtuvieron porcentajes mas altos de IgGAP en los niños con PTI comparativamente con aquellos con trombocitopenia no inmune, sin embargo en los adultos la distribución de valores positivos fue muy similar entre ambos grupos de padecimientos. En general, el porcentaje de plaquetas con anticuerpos IgM fue menor que aquellas con anticuerpos IgG.

8.2 VALORES DE IgAP

Se midieron las IgAP en 117 pacientes niños y adultos, 62 con un diagnóstico clínico establecido de trombocitopenia por mecanismo patogénico inmune (PTI, LES y SAFP) y 55 con trombocitopenia de naturaleza no inmune ocasionada por múltiples padecimientos como se muestra en la Tabla 3 y 3a. En 56 de los 62 casos (90.3%) de trombocitopenias

inmunológicas, las IgAP resultaron elevadas, pero también en 34 de los 55 casos (61.8%) de trombocitopenias de causa no inmunológica. De los 57 pacientes con PTI que se estudiaron, 51 (89.5%) tuvieron las IgAP elevada, al igual que los 5 casos restantes (100%) de trombocitopenias de naturaleza inmune.

TABLA 3
Ig asociadas a plaquetas (IgAP) en pacientes

| | No. total estudiado | No. pacientes con IgAP elevada |
|---|---------------------|-----------------------------------|
| Padecimientos inmunológicos clásicos | | |
| • Púrpura trombocitopénica idiopática | 57 | 51 |
| • Lupus eritematoso sistémico | 4 | 4 |
| • Síndrome antifosfolípido primario | 1 | 1 |
| Total | 62 | 56 |

TABLA 3 a
Ig asociadas a plaquetas (IgAP) en pacientes

| | No. total estudiado | No. pacientes con IgAP elevada |
|-----------------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| Enfermedades neoplásicas | | |
| • Enfermedad linfoproliferativa | 6 | 3 |
| • Carcinoma | 4 | 3 |
| • Leucemia aguda | 14 | 6 |
| Enfermedades hepáticas | | |
| • Cirrosis hepática por virus C | 4 | 4 |
| • Cirrosis | 8 | 5 |
| Síndromes de falla medular | | |
| • Anemia aplástica | 4 | 4 |
| • Síndromes mielodisplásicos | 3 | 1 |
| Enfermedades misceláneas | | |
| • Hiper o hipotiroidismo | 5 | 3 |
| • Anemia megaloblástica | 2 | 2 |
| • Diabetes melitus | 2 | 2 |
| • Insuficiencia renal crónica | 1 | 0 |
| • Tuberculosis | 2 | 1 |
| Total | 55 | 34 |

La elevación de la IgAP en trombocitopenia no inmune se observó en los 4 subgrupos de padecimientos establecidos y no mostró predilección por ninguno de ellos.

De los 17 pacientes con PTI aguda en 16 (94%) la IgAP resultó elevada. El 71% de los pacientes tuvieron IgG e IgM elevadas y 23% solamente la IgG. Ninguno de los pacientes presentó la IgM elevada exclusivamente (Tabla 4).

De los 45 pacientes con PTI crónica (incluyendo a los 4 pacientes con LES y al paciente con SAFP) en 40 (88.9%) las IgAP resultaron incrementadas. El 60% de los pacientes tuvieron una elevación combinada de 2 subtipos de Igs (IgG e IgM), 20% aumento de IgG y 9% de IgM exclusivamente. No se observó una clara distinción entre los pacientes con PTI aguda y PTI crónica cuando se valoraron en función del porcentaje de casos con IgAP o de los subtipos de Igs elevadas, aunque el aumento de IgMAP exclusivamente se observó en PTI crónica y no en la aguda .

TABLA 4

Tipos de IgAP en pacientes con PTI

| | IgG+ | IgM+ | IgG + e IgM + | Ninguna | Total |
|--------------|-----------------|---------------|-----------------|----------------|-----------|
| PTI aguda | 4 (23%) | 0 | 12 (71%) | 1 (6%) | 17 |
| PTI crónica | 9 (20%) | 4 (9%) | 27 (60%) | 5 (11%) | 45 |
| Total | 13 (21%) | 4 (6%) | 39 (63%) | 6 (10%) | 62 |

FIGURA 9
Distribución de valores de IgGAP en niños

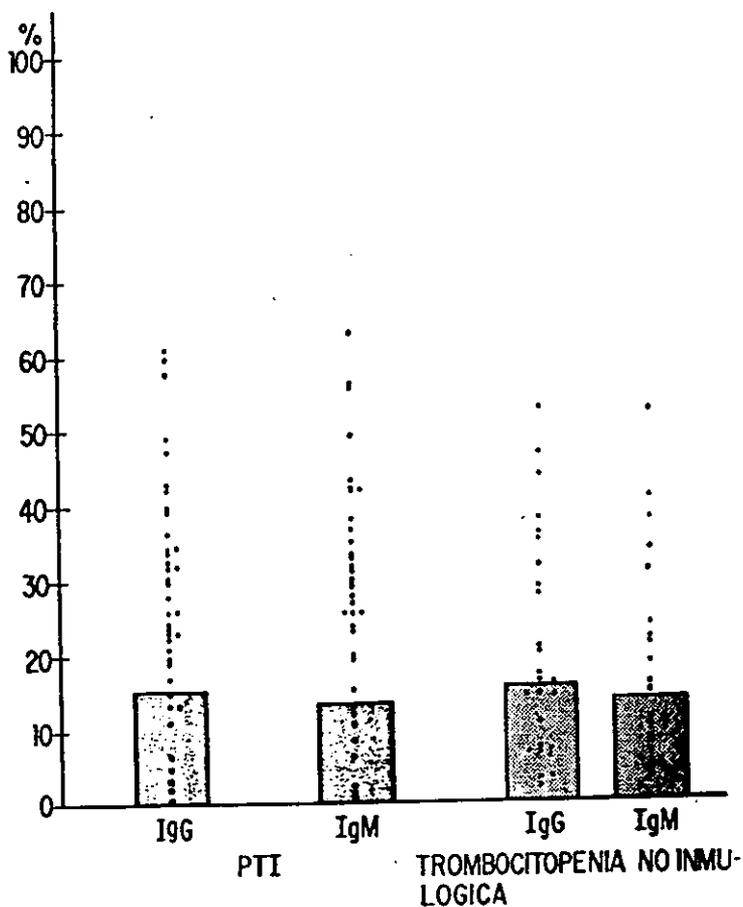
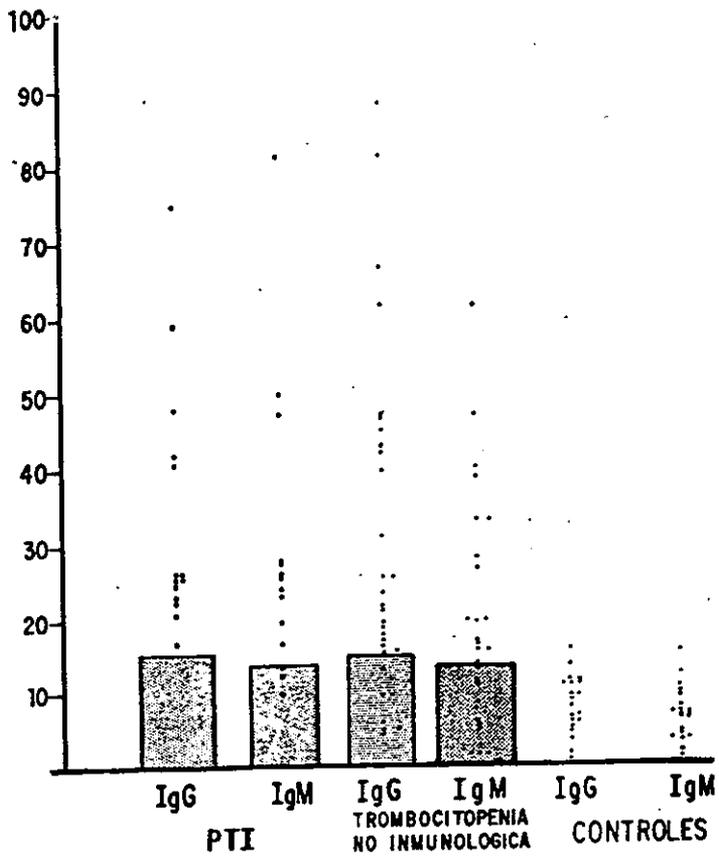


FIGURA 10

Distribución de valores de IgAP en adultos



8.3 CALCULOS ESTADISTICOS

El análisis de los datos de los individuos estudiados mostró los siguientes resultados:

| IgAP | PTI | no PTI |
|------|---------|---------|
| + | a 56 | b 34 |
| - | c 6 | d 21 |

- Sensibilidad = 90.3 %
 - Especificidad = 38.2 %
 - Valor predictivo positivo = 62.2 %
 - Valor predictivo negativo = 77.8%
-

Prueba exacta de Fisher.

Tabla de contingencia (2 x 2):

| C | PTI | | IgAP | |
|---|-----|----|------|---|
| | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 1 | 56 | 6 | 62 | |
| 2 | 34 | 21 | 55 | |
| | 90 | 27 | 117 | |

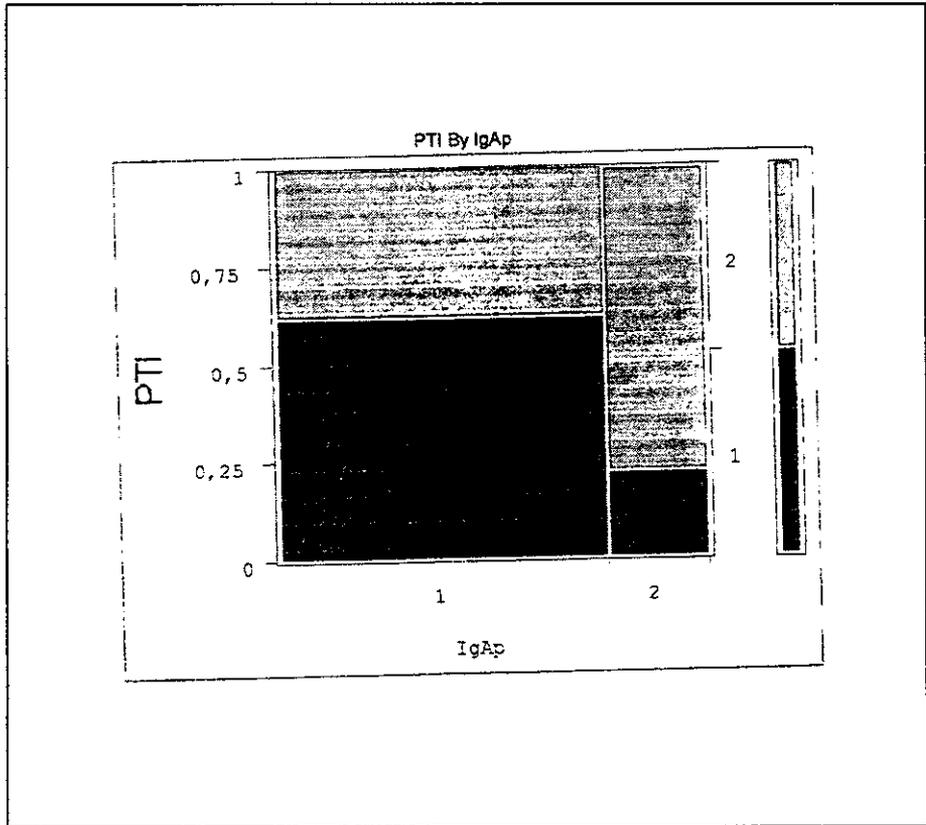
Grados de libertad = 1

Las frecuencias de los resultados positivos y negativos se analizaron para los casos de PTI y no PTI y se pueden observar en la Figura 11.

La prueba proporcionó los siguientes resultados:

| |
|----------------|
| $X^2 = 13.839$ |
| $P = 0.0002$ |

Figura 11



IX DISCUSION

Desde que en 1975 McMillan y cols. ⁽⁶⁴⁾ y Dixon & Rose ⁽⁶⁵⁾ informaron por primera vez que en los pacientes con PTI la concentración de IgGAP se encontraba muy aumentada y que ésta representaba autoanticuerpos unidos a las plaquetas circulantes, se han desarrollado alrededor de 20 métodos para la detección y cuantificación de los autoanticuerpos plaquetarios. En los estudios iniciales (Hedge 1977, Cines & Shreiber 1979, Lingham 1979, Leporrier 1979), realizados en grupos pequeños de pacientes se encontró que prácticamente el 100% de los niños o adultos con PTI aguda o crónica tenían concentraciones elevadas de IgAP, y que, con raras excepciones, las IgAP se encontraban dentro de límites normales en pacientes con trombocitopenias no inmunológicas. Sin embargo, en los estudios de Mueller-Eckhard C. y cols. ⁽⁶⁶⁾ y de Kelton JG y cols. ⁽⁶⁷⁾ realizados en 298 y 169 pacientes trombocitopénicos con diferentes padecimientos, respectivamente, se confirmó la alta sensibilidad de las IgGAP en la detección de trombocitopenia inmune pero también se demostró claramente una elevación significativa de las IgGAP en muchos padecimientos que cursaban con trombocitopenia no inmune.

Con el surgimiento, en la década pasada, de la citometría de flujo para el estudio de los antígenos de la membrana celular, de inmediato se implementaron las técnicas para emplear esta metodología en la cuantificación de IgAP. Esta metodología, comparativamente con las

técnicas inmunológicas ofrecía las siguientes ventajas: 1) en el citómetro se podía identificar la contaminación de las plaquetas con eritrocitos y leucocitos, y sin necesidad de una preparación especial de la muestra se podía aislar electrónicamente a las plaquetas, y en esta forma restringir la medición a las inmunoglobulinas asociadas a las mismas; 2) el citómetro determinaba la IgAP en plaquetas individuales y si la cuantificación se realizaba en 10 000 o en 100 000 células, se obtenía una buena precisión en el porcentaje de células con IgAP; 3) no era necesario procesar gran cantidad de muestra para obtener el número suficiente de plaquetas; 4) la medición se realizaba en las plaquetas en suspensión y por lo tanto era muy remota la posibilidad que quedara Ig atrapada en los intersticios de la plaqueta.

La detección de IgAP empleando citometría de flujo ha sido objeto de varias publicaciones, entre ellas, las de Corash & Rheinschmidt ⁽⁶⁸⁾ quienes estudiando 171 pacientes con trombocitopenia o con sospecha clínica de un defecto plaquetario, informaron una sensibilidad de 93.8% y una especificidad de 94.5% en la identificación de pacientes con trombocitopenia mediada por un proceso inmune. Rosenfeld CS y cols. ⁽⁶³⁾ incluyeron la detección de IgGAP, IgMAP, IgAAP y albúmina asociada a la superficie de la plaqueta en 44 pacientes con diagnóstico clínico de PTI y en 32 pacientes con trombocitopenia no inmunológica. Estos autores informaron concentraciones elevadas de IgG e IgM en la superficie de las plaquetas del 90.9% de pacientes con PTI, y sólo en 9.3% de los pacientes con trombocitopenia no inmune obtuvieron resultados falsos positivos. Además, estos

autores al igual que Kelton y cols. ⁽⁶⁷⁾ encontraron una correlación directa entre IgAP y albúmina asociada a la superficie de las plaquetas, fenómeno que les llevó a postular la hipótesis de que algunos agentes, posiblemente "IgG patológica" dañaban la membrana de la plaqueta y esta membrana dañada unía, inespecíficamente, proteínas del plasma. En un estudio de 299 pacientes sin diagnóstico clínico definido, Ault y cols. ⁽⁵⁷⁾ encontraron concentraciones aumentadas de IgAP en el 63% de los pacientes. En los estudios mencionados hasta aquí, los resultados de la detección de IgAP se expresaron cualitativamente, o como unidades arbitrarias basadas en intensidad de fluorescencia. En un trabajo más reciente, Chistopoulos y cols. ⁽⁶⁸⁾ realizaron la cuantificación de IgGAP para expresarla como número de moléculas. Las plaquetas de 16 pacientes con diagnóstico de PTI tuvieron una concentración de IgGAP similar a la del grupo control constituido por 71 sujetos sanos, sin embargo 22 de 62 pacientes con trombocitopenia clínicamente no explicada mostraron concentración elevada de IgGAP.

Desde el punto de vista diagnóstico, la impresión general es que los métodos citofluorográficos son útiles para establecer trombocitopenia mediada por proceso inmune. Sin embargo, es importante enfatizar que la población de pacientes que se eligen para establecer la utilidad diagnóstica de una prueba de laboratorio (sensibilidad y especificidad clínicas) es crucial. Este proceso puede, potencialmente, llevar a resultados artificialmente favorables y cuando la prueba se aplica a un amplio espectro de condiciones, clínica y biológicamente relacionadas con el padecimiento en cuestión puede mostrar ser menos específica. Posiblemente esta sea la explicación de la alta sensibilidad y especificidad de la

IgGAP, medida por citometría de flujo, en el diagnóstico de trombocitopenia inmune informada por los autores mencionados. En el presente estudio realizado en pacientes con PTI y con trombocitopenia debida a diferentes padecimientos y empleando citometría de flujo, encontramos una alta sensibilidad (90.3%) pero una pobre especificidad (38.2%) de las IgGAP e IgMAP en el diagnóstico de trombocitopenias inmunes. Estos resultados indican que una prueba de IgAP positiva es un hallazgo relativamente no específico y que un amplio espectro de padecimientos que cursan con trombocitopenia muestran concentraciones elevadas de IgAP. Esto se debe en parte a la incapacidad de la prueba de IgAP para determinar la naturaleza de la interacción del anticuerpo con la plaqueta (antígeno-específico vs unión no específica). Por lo tanto, consideramos que esta prueba no permite discriminar la especificidad antigénica de los aparentes anticuerpos antiplaquetas.

El valor predictivo negativo de 77.8% obtenido de nuestros pacientes establece la utilidad clínica parcial de la detección de IgAP permitiendo afirmar que un resultado negativo en un paciente con trombocitopenia, hace poco probable el diagnóstico de PTI.

Por otro lado, las frecuencias de los casos positivos y negativos se analizaron en PTI y no PTI en una tabla de contingencia de 2 x 2 y aplicando la prueba de Fisher, bajo la hipótesis que los factores son independientes, los valores de χ^2 (13.839) y de p (0.0002) indican que los factores son dependientes (la hipótesis nula se rechaza). En teoría el método presenta buenas expectativas de calidad en cuanto a la sensibilidad, sin embargo en términos clínicos no es aceptable la especificidad encontrada.

En relación a las clases de inmunoglobulinas, en el presente estudio encontramos que la elevación de sólo IgMAP se observó en el 6% de los pacientes con PTI, en tanto que el 84%

de los mismos se identificó IgGAP, sólo o en combinación con IgMAP. Estos datos coinciden con los informados por Rosenfeld C. y cols. ⁽⁵⁷⁾ quienes encontraron que el 75% de 44 pacientes con PTI tuvieron elevadas las IgGAP ya fuera como única clase de inmunoglobulina o en combinación con IgM o IgA, y 11% de los pacientes con PTI mostraron elevación de sólo IgMAP.

Un concepto relativamente reciente es que la trombocitopenia de la PTI se produce por la unión de las plaquetas a los autoanticuerpos dirigidos contra glicoproteínas de la superficie plaquetaria, especialmente a los complejos IIb/IIIa y Ib/IX, y la subsecuente depuración por el SRE. Para la identificación de estos autoanticuerpos se han desarrollado técnicas que emplean el principio de la inmunomancha, inmunoprecipitación o los ensayos de captura o inmovilización de antígenos (MAIPA) que miden la unión de inmunoglobulinas a las glicoproteínas plaquetarias mencionadas. Aún cuando este enfoque parece promisorio, todavía no se cuenta con el "estándar de oro" para establecer la naturaleza autoinmune de la trombocitopenia.

X CONCLUSIONES

Con la citometría de flujo, fue posible la identificación de las plaquetas en el histograma de dispersión frontal (FS) vs dispersión lateral (SS), donde la escala logarítmica fue indispensable para la adecuada localización de las plaquetas. La población de interés se aisló electrónicamente (gate) y esto permitió estudiar a las plaquetas, libres de células contaminantes. El anticuerpo monoclonal CD41-F, que reconoce a la glicoproteína plaquetaria IIb / IIIa, presente en las células de estirpe megacariocítica, resultó de gran utilidad para asegurar que la población aislada y posteriormente estudiada fueran realmente plaquetas. Se observó un patrón de fluorescencia fuerte del CD41 en el histograma de un parámetro (FL1) vs cuenta. La muestra requerida (5 – 10 mL) de sangre resultó ser de fácil obtención en todos los individuos a quienes se les realizó la prueba, este tipo de muestra tiene la ventaja que produce un mínimo de trauma en el paciente. Se debe resaltar que los pasos críticos del procedimiento fueron : 1) en la fijación de las plaquetas con la solución de paraformaldehído, no se deben variar el tiempo y la temperatura, ya que se notó que plaquetas incubadas por tiempo mayor presentaban diferentes valores de IgAP. Así mismo la plaquetas incubadas a 4⁰ C . 2) La concentración de plaquetas de 5×10^6 /mL (200 μ L), resultó satisfactoria en relación a la cantidad de anticuerpo monoclonal utilizado, así como para obtener un número de plaquetas adecuado para el análisis en el citómetro. Con la cuantificación de alrededor de 20 000 eventos por muestra se obtuvo una buena precisión en

el porcentaje de células con IgAP. El procedimiento mostró la ventaja de ser fácilmente realizable y además rápido.

En el presente estudio, se obtuvo una alta sensibilidad (90.3%) pero una baja especificidad (38.2%) al cuantificar IgAP e IgMAP para diagnosticar trombocitopenias inmunes. A partir del valor predictivo negativo (77.8%), se encontró que la utilidad clínica de la prueba fue satisfactoria en forma parcial ya que en la detección de IgAP se puede afirmar que un resultado negativo en un paciente con trombocitopenia, hace poco probable el diagnóstico de PTI. En cuanto al tipo de Ig detectada, se encontró que 75% de los pacientes con PTI tuvieron elevadas las IgAP como IgG sola o en combinación con IgM. Sólo 11% de los pacientes se les detectó IgMAP únicamente.

En resumen se puede concluir que:

- Se demostró que la detección de concentraciones elevadas de IgGAP e IgMAP constituye una prueba sensible pero poco específica para diagnosticar la naturaleza autoinmune de las trombocitopenias.
- Se demostró la utilidad clínica limitada de la detección de IgAP en el sentido que un resultado negativo pudiera descartar el diagnóstico de PTI.
- Se confirmó que en más de 80% de los pacientes con PTI, las IgAP corresponden a IgG sola o en combinación con IgM.

X BIBLIOGRAFIA

- 1- George JN, El-Harake MA, Aster RH. Thrombocytopenia due to enhanced platelet destruction by immunologic mechanisms Cap.128, Ernest Beutler, Marchal A. Litchman, Barry S. Coller, Thomas J. Kipps. en Williams Hematology . McGraw-Hill, Inc. Fifth Edition 1996, pp.1315-1317
- 2- Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, Moore CV. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. J Lab Clin Med 38: 1-10, 1951
- 3- Shulman NR, Leissinger GA, Hotchkiss AJ, et al. The nonspecific nature of platelet associated IgG. Trans Assoc Am Physicians 95: 213-220, 1982
- 4- Dixon RH, Rosse WF, Ebbert L. Quantitative determination of antibody in idiopathic thrombocytopenic purpura: Correlation of serum and platelet-bound antibody with clinical response. N Engl J Med 292: 230-236, 1975
- 5- Van Leeuwen EF, van der Ven JTH, Engelfriet CP, et al. Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. Blood 59:23-26, 1982
- 6- Kelton JG. The measurement of platelet-bound immunoglobulin: An overview of the methods and the biological relevance of platelet associated IgG. Prog Hematol 13: 163-199, 1983
- 7- Emami A. Idiopathic thrombocytopenic purpura of childhood. Indian J Pediatr 54: 369-377, 1987
- 8- Cohn J. Thrombocytopenia in childhood: An evaluation of 433 patients. Scand J Haematol 16: 226, 1976
- 9- Walker RW, Walker W. Idiopathic thrombocytopenia, initial illness and long term follow-up. Arch Dis Child 59: 316, 1984
- 10- Zaki M, Hassanein AA, Khalil AF. Childhood idiopathic thrombocytopenic purpura: Report of 60 cases from Kuwait. J Trop Pediatr 36: 10, 1990
- 11- Picozzi VJ, Roeske WR, Creger WP. Fate of therapy failures in adult idiopathic thrombocytopenia purpura. Am J Med 69: 690, 1980

- 12- McWilliams NB, Maurer HM. Acute idiopathic purpura in children. *Am J Hematol* 7: 87-96, 1979
- 13- Lusher JM, Emami A, Rabindranath Y. Idiopathic thrombocytopenic purpura in children. The case for management without corticosteroids. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 6: 149-157, 1984
- 14- Lingshoy AL, Koenig HM, McMillan R, Stone JR. Platelet-associated immunoglobulin in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Pediatr* 94: 201-204, 1979
- 15- Mueller-Eckhardt C. Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP): Clinical and immunologic considerations. *Sem Thromb Haemost* 3: 125-159, 1977
- 16- Kelton JG, Gibbons S. Autoimmune platelet destruction: Idiopathic thrombocytopenia purpura. *Sem Throm Hemost* 8: 83-104, 1992
- 17- Woods VL, Oh EH, Mason D, McMillan R. Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic ITP. *Blood* 63: 368-375, 1984
- 18- Woods VL, Kurata Y, Montgomery RR, Tani P, Mason D, Oh EH, McMillan R. Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 64: 156-160. 1984 a
- 19- Villet HH, van Kappers-Klume, Hel JW, van der Abels J. Antibodies against glycosphingolipids in sera of patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 67: 103-108, 1987
- 20- Koerner TA, Noinfeld H M, Bullard LS and Williams LC. Antibodies against platelet glycosphingolipids. Detection in serum by quantitative HPTLC- autoradiography and association with autoimmune and alloimmune processes. *Blood* 74: 274-278, 1989
- 21- Tsubakio P, Tani VL, Woods JR, McMillan R. Autoantibodies against platelet Gp IIb/IIIa in chronic ITP react with different epitopes. *Br J Haematol* 67: 345-348, 1987
- 22- Tomiyama Y, Kurata Y, Mizutani Y, Kanakura T, Tsubakio T, Yonezawa Y, Takui S. Platelet glycoprotein IIb as a target antigen in two patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 63: 535-538, 1987.

- 23- Lurhuma AZ, Ricconi H, Masson PL. The occurrence of circulating immune complexes and viral antigens in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Clin Exp Immunol* 28: 49-55, 1977
- 24- Karpatkin S. Autoimmune Thrombocytopenic purpura. *Blood* 56: 329-332, 1980
- 25- Branehog I, Kutti J, Ridell B, Swolin B, Weinfeld A. The relation of thrombokinetics to bone marrow megakaryocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 45: 551-557, 1977
- 26- Harker LA. Thrombokinetics in Idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 19: 95, 1970
- 27- McMillan R, Longmire RL, Yelenosky R. Quantitation of platelet-binding IgG produces in vitro by spleens from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *New Eng J Med* 291: 812-817, 1974
- 28- McMillan R, Martin M. Fixation of C3 to platelets in vitro by antiplatelet antibody from patients with immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 47: 251-256, 1981
- 29- Von der Borne AEG, van Leeuwen EF, von Riesz LE. Neonatal alloimmune thrombocytopenia: detection and characterization of the responsible antibodies by the platelet immunofluorescence test. *Blood* 57: 649-656, 1981
- 30- Reinherz EL and Schlossmann SF. The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell* 19: 821-827, 1980
- 31- Morimoto C, Abe T, Hara M, Homma M. Cell-mediated immune response in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Clin Immunol Immunopathol* 8: 181, 1977
- 32- Ware RE, Howard TA. Elevated numbers of gamma-delta ($\gamma\delta$) + T lymphocytes in children with immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 80: 479^a, 1992
- 33- Kernoff IM, Blake KC and Shackleton D. Influence of the amount of platelet-bound IgG on platelet survival and site of sequestration in autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 55: 730-733, 1980
- 34- Fehr J, Hofmann V, Kappler U. Transient reversal of thrombocytopenia in idiopathic thrombocytopenic purpura by high-dose intravenous gammaglobulin. *New Eng J Med* 306: 1254-1258, 1982
- 35- McMillan R. Immune thrombocytopenia. *Clin Haematol* 12: 69-79, 1983
- 36- Schwartz KA. Platelet antibody: Review of detection methods. *Am J Hematol* 29: 106-114, 1988

- 37- Coombs RA, Bedford D: The A y B antigens on human platelets demonstrated by means of mixed erythrocyte-platelets agglutination. *Vox San* 95:111, 1995
- 38- Horowitz HI, Rappaport HI, Young RC, Fijimoto MM. Change in platelet factor 3 as a means of demonstrating immune reactions involving platelets: Its use as a test for quinidine-induced thrombocytopenia. *Transfusion* 5: 336-343, 1995
- 39- Karpatkin M, Siskind GW, Karpatkin S. The platelet factor 3 immunoinjury technique re-evaluated. Development of a rapid test for antiplatelet antibody. Detection in various clinical disorders, including Immunologic drug-induced and neonatal thrombocytopenias. *J Lab Clin Med* 89: 400-408, 1977
- 40- Pogliani E, Deliliers GL, Ferrari R, et al. Platelet aggregometry and antiplatelet isoantibodies. *Hemostasis* 4: 23-25, 1975
- 41- Deykin D, Hellerstein LJ. The assessment of drug-dependent and isoimmune antiplatelet antibodies by the use of platelet aggregometry. *J Clin Invest* 51: 3142-3153, 1972
- 42- Bridges JM, Baldini M, Fichera C, Dameshek W. Effect of antiplatelet antibodies on the in vitro uptake of 5-hydroxytryptamine by blood platelets. *Nature* 197: 364-366, 1963
- 43- Wu KK, Hoak JC, Thompson JS, et al. Use of platelet aggregometry in selection of compatible platelet donors. *N Engl J Med* 292: 130-133, 1975
- 44- Hirschman RJ, Shulman NR. The use of platelet serotonin release a sensitive method for detecting antiplatelet antibodies and a plasma antiplatelet factor in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 24: 793, 1973
- 45- Dixon R, Rosse W, Ebbert L. Quantitative determination of antibody in idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 292: 230-236, 1975
- 46- McMillan R, Smith RS, Longmore RL, et al. Immunoglobulins associated with human platelets. *Blood* 37: 316-322, 1971
- 47- Soulier JP, Patereau C, Drouet J. Platelet indirect radioactive Coomb test. Its utilization for Pl_{a_1} grouping. *Vox Sang* 29: 253-268, 1975

- 48- LoBuglio AF, Court WS, Vinocur L, et al. Immune thrombocytopenic purpura. Use of a ¹²⁵I-labeled antihuman IgG monoclonal antibody platelet-bound IgG. *N Engl J Med* 309: 459-463, 1983
- 49- Cines DB, Schreiber AD. Immune thrombocytopenia. *N Engl J Med* 300: 106-11, 1979
- 50- Shaw GM, Axelson J, Maglott JG, LoBuglio AF. Quantification of platelet-bound IgG by ¹²⁵I-staphylococcal protein A in immune thrombocytopenic purpura and other thrombocytopenic disorders. *Blood* 63: 154-161, 1984
- 51- Hymes K, Schur PH, Kartpatkin S. Heavy-chain subclass of bound antiplatelet IgG in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Blood* 56: 84-87, 1980
- 52- Schiffer CA, Young V. Detection of platelet antibodies using a micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Blood* 61: 311-317, 1983
- 53- Hedge UM, Bowes A, Powell DK, Joyner MV. Detection of platelet-bound and serum antibodies in autoimmune thrombocytopenia by enzyme-linked assay. *Vox Sang* 41: 306-312, 1981
- 54- Horai S, Class FH, vanRood JJ. Detection of platelet antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on artificial monolayers of platelets. *Immunol Lett* 3: 67-72, 1981
- 55- Andersen E, Bashir H, Archer GT. Modification of the platelet suspension immunofluorescence test. *Vox Sang* 40:44-47, 1981
- 56- Sugiura K, Steiner M, Baldini MG. Platelet antibody in idiopathic thrombocytopenic purpura and other thrombocytopenias. *J Lab Clin Med* 96: 640-653, 1980
- 57- Ault KA. Flow cytometric measurement of antiplatelet associated immunoglobulin. *Pathol Immunopath Res* 7: 395-408, 1988
- 58- Lovett JE, Shnitzer B, Keren DF, Flint A, Hudson JL, McClatchey KD. *Lab Invest* 50: 115-140, 1984
- 59- Feinstein AR. On the sensitivity, specificity, and discrimination of diagnostic tests. *Cap.15 en Clinical Biostatistics* . CV Mosby Company, 1977, pp 214-226
- 60- Castilla SL, Cravioto J. Probabilidad exacta de Fisher y Yates. *Cap.8 en Estadística simplificada para la investigación en ciencias de la salud*. Ed. Trillas, 1991, pag. 129-131

- 61- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester R.J. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271, 1982
- 62- León S, Amigo MC, Casanova JM, Reyes PA. El síndrome de antifosfolípidos primario, experiencia clínica en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chavez. *Arch Inst Cardiol Mex* 61: 149-155, 1991
- 63- Rosenfeld CS, Nichols G, Bodensteiner DC. Flow Cytometric measurement of antiplatelet antibodies. *Am J Clin Pathol* 87: 518-522, 1987
- 64- McMillan R, Luiken GA, Gordon P, Lightsey AL, Gribble TJ & Schulman I. Platelet associated IgG (PAIgG): An assay of antiplatelet antibody (APA) in immune thrombocytopenic purpura (IPT). (Abstract). *Bood* 46:1034, 1975
- 65- Dixon RH & Rosse WF. Platelet antibody in autoimmune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 31: 129-134, 1975
- 66- Mueller-Eckardt C, Kayser K, Mersch-Baumert G, Mueller-Eckardt G, Breidenbach M, Kugel HG and Graubner M. *Bh J Haematol* 46: 123-131, 1980
- 67- Kelton JG, Neame PM, Gauldie J, Hirsh J. Elevated platelet-associated IgG in the thrombocytopenia of septicemia. *N Engl J Med* 300: 760-764, 1979
- 68- Corash L, Rheinschmidt M. Detection of platelet antibodies with a fluorescence activated flow cytometric technique; en Rose, Friedman, Fahey eds.: *Manual Of Clinical Laboratory Immunology*. Washington, American Society for Microbiology, 1986, pp 254-257
- 69- Chistopoulos CG, Kelsey HC, Machin SJ. A flow-cytometric approach to quantitative estimation of platelet surface immunoglobulin G. *Vox Sang* 64: 106-115, 1993