



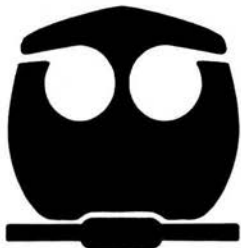
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**DETERMINACION DE ANTICUERPOS
ANTI-PLAQUETAS EN PACIENTES CON PURPURA
TROMBOCITOPENICA INMUNOLOGICA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
MARIA EVA RODRIGUEZ SALCEDO**



MEXICO, D.F.



2004

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**



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.

JURADO ASIGNADO

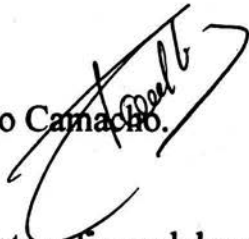
PRESIDENTE : PROF. RAUL NIETO CAMACHO.
VOCAL : PROF. SATURNINO DE LEON CHAPA.
SECRETARIO : PROF. LAURA PENICHE VILLALPANDO.
1ER. SUPLENTE : PROF. ROSANA PELAYO CAMACHO.
2DO. SUPLENTE : PROF. MONICA BERENICE HERAS CHAVARRIA.

Sitio donde se desarrollo el tema.

Hospital de Especialidades C.M.N. siglo XXI

Nombre completo y firma del asesor del tema.

Raúl Nieto Camacho.



Nombre completo y firma del sustentante.


María Eva Rodríguez Salcedo.

A LA MEMORIA DE MI ABUELO MIGUEL

A mis padres, los mejores del mundo
con todo mi cariño y respeto por
haberme enseñado el camino.

A mis hijas Alejandra e Ileana,
el mejor regalo que me ha dado
la vida.

A Alfonso con amor.

A mis hermanos que siempre me han
brindado todo su apoyo.
Gracias por ser mis hermanos

A mi abuela, otra gran mamá.

Mi agradecimiento al Q. Raúl Nieto por sus valiosas enseñanzas y apoyo para realizar este trabajo.

A Luzma, Carmen, Cris, Marysela, Reyna, Candy, Bety, Ernesto, Alejandro, y a todos los que siempre me animaron a seguir adelante. GRACIAS

INDICE

OBJETIVOS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
GENERALIDADES.....	2
Estructura de la plaqueta.....	4
Acción de las plaquetas durante la hemostasia.....	6
Metabolismo de la plaqueta.....	8
Distribución y vida media de las plaquetas.....	10
Clasificación de los desórdenes plaquetarios.....	11
PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA INMUNOLÓGICA	14
Manifestaciones clínicas.....	15
Hallazgos de laboratorio.....	16
Diagnóstico diferencial.....	17
Pronóstico.....	19
Tratamiento de púrpura trombocitopénica inmunológica.....	20
MÉTODOS EMPLEADOS PARA DETECTAR	
ANTICUERPOS ANTIPLAQUETAS.....	22
MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
Método propuesto.....	28
Tiempo de sangrado.....	29
Prueba de fragilidad capilar.....	30
Retracción del coágulo.....	30

RESULTADOS.....	31
DISCUSIÓN.....	36
CONCLUSIONES.....	40
BIBLIOGRAFIA.....	41

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PLAQUETA EN PACIENTES CON PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA INMUNOLÓGICA

OBJETIVOS

- Comparar la técnica propuesta para la demostración de anticuerpos (Ac) anti-plaqueta en pacientes con diagnóstico de púrpura trombocitopénica inmunológica (PTI) con los procedimientos utilizados tradicionalmente de inmunofluorescencia, ELISA, MAIPA.
- Establecer mediante la técnica propuesta la incidencia de anticuerpos fríos, calientes o bifásicos.

INTRODUCCIÓN

Una de las patologías hematológicas mas comúnmente observadas en los centros de concentración hospitalaria es la PTI. La etiopatogenia de este trastorno es la formación de auto anticuerpos dirigidos contra alguna o algunas de las glicoproteínas plaquetarias, una vez unidos los Ac anti-plaqueta, lo cual ocurre en torrente sanguíneo, las plaquetas recubiertas de ellos son detectadas por el sistema mononuclear fagocítico, particularmente por el bazo con lo que el paciente tenderá a una cada vez más severa disminución de dichos elementos formes. La caída a cifras críticas conducirá al paciente a presentar manifestaciones clínicas caracterizadas por trastornos hemorrágicos sobre todo de tipo petequiales.

El diagnóstico de PTI se sospecha por las alteraciones clínicas del paciente así como recuentos de plaquetas francamente bajos, además de un incremento en el volumen

plaquetario medio, el cual puede ser medido en los equipos de alta tecnología o bien por la apreciación de plaquetas gigantes o anisocitosis plaquetaria en el frotis de sangre periférica. Generalmente se acepta que en la PTI no hay otras manifestaciones clínicas asociadas ni tampoco otras alteraciones en los parámetros de laboratorio, la punción de médula ósea denota la presencia de megacariocitos buenos formadores de plaquetas, sin embargo para confirmar el diagnóstico se requiere efectuar la determinación de Ac anti-plaquetas.

La dificultad y el grado de complejidad que implica la realización de Ac anti-plaquetas limita mucho el estudio integral en este tipo de patologías, razón por la cual se propone un procedimiento que pueda ser accesible de realizarse en cualquier laboratorio de hematología rutinaria. El fundamento de este procedimiento es como el de cualquier otra prueba inmunológica, se trata de demostrar la presencia de Ac en el suero del sujeto a estudio, para ello se pondrá en contacto con antígenos plaquetarios provenientes de donadores sanos, posteriormente se efectuará un recuento inicial de plaquetas y después de una hora de incubación a diferentes temperaturas se realizará un segundo recuento, en caso de coexistir antígenos y anticuerpos en el sistema, la cifra de plaquetas inicial tendrá una caída significativa.

GENERALIDADES

Las plaquetas se producen a nivel de médula ósea y particularmente por la fragmentación del citoplasma de los megacariocitos, este proceso es conocido como trombopoyesis en el que además participan ciertos reguladores hematopoyéticos como algunas interleucinas y desde luego la llamada trombopoyetina. La maduración se inicia con la diferenciación de una célula pluripotencial denominada célula madre mieloide, la cual cuenta con receptores membranales para los diversos componentes promotores de diferenciación, una vez iniciada la activación, la célula tronco realiza una primera fase mitótica cuyo resultado son

dos células “hijas”, una conserva la capacidad de autopropagación por medio de las llamadas sustancias polares y la otra esta totalmente desreprimida para iniciar la diferenciación. En esta etapa se considera al precursor celular como comprometido o unipotencial y en etapas posteriores, el núcleo sufrirá divisiones pero el citoplasma solo aumentará de tamaño, a este evento se le conoce como poliploidia o endoreduplicación. A lo largo de la maduración, el megacariocito experimenta cambios morfológicos muy variados, paulatinamente va aumentando su contenido citoplasmático y empiezan a formarse lo que se conoce como zonas de demarcación debido a la ramificación del sistema retículo endoplásmico rugoso, en cuanto al núcleo en las primeras etapas es tetraploide (4N) y poco a poco se incrementa esta relación pudiendo llegar hasta 64 N, como es de esperarse, el diámetro del megacariocito maduro es considerable y esta característica permite diferenciarlo en aspirados de médula ósea aún a pequeño aumento (10X), (1), (Fig. 1)

Mediante estudios de cinética plaquetaria usando diisopropilfluorofosfato (P32) se ha calculado que un megacariocito produce entre 3000 y 8000 plaquetas. La médula ósea aporta un 80 % de la producción y el resto el pulmón, este hecho es desconcertante pero se han obtenido megacariocitos en el ducto torácico y con capacidad para producir plaquetas cuando son cultivados en medios semisólidos, enriquecidos con factores de diferenciación adecuados. (2,3).

Las plaquetas se van separando paulatinamente de la célula pluripotencial hasta que solo quedan los remanentes nucleares que serán fagocitados por las células reticulares gigantes que además actúan como fosas metabólicas, la salida de plaquetas de la médula a la microcirculación está condicionada por la trombopoyetina y probablemente por otros reguladores que en este punto no han sido bien dilucidados. El trombocito llega a la circulación sanguínea en forma de un disco regular o discretamente ovoide, el diámetro es de 1 a 3 micras y su volumen varía entre 2 hasta 20 fl, (4).

ESQUEMA DE TROMBOPOYESIS

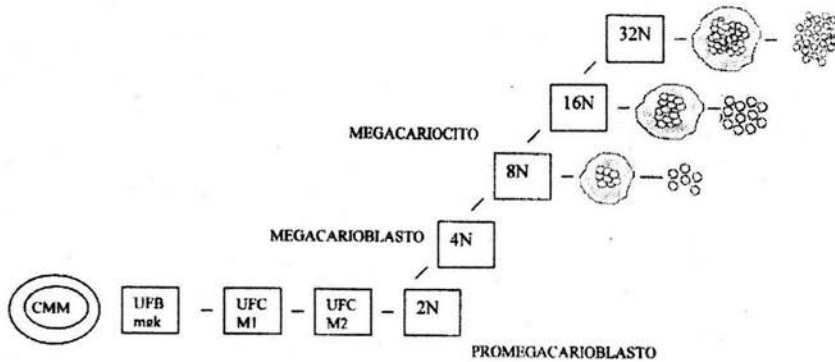


Fig. 1

Estructura de la Plaqueta

La plaqueta está constituida por tres zonas o regiones, la zona membranosa, una zona sol-gel y la zona granular, cada una de las cuales le permite a la plaqueta cumplir su cometido hemostático. La zona membranosa a su vez se divide en una área periférica y una submembranosa, la primera constituye la superficie de la plaqueta y su función es la de proteger la integridad de la plaqueta, su típica estructura de lípidos y proteínas permite la fijación de las glicoproteínas (Gp) que participan activamente en la función plaquetaria como es la adhesividad y la agregación plaquetarias, dichas proteínas se encuentran adsorbidas a la superficie o bien forman parte estructural de la membrana celular, dentro de estas últimas, se encuentran los antígenos del sistema mayor de histocompatibilidad (HLA), las Gp que permiten que la plaqueta sea funcional actuando como los receptores para el factor VIII o el complejo glucoproteico GpIb/IIIa (CD41) y el GpIb/X (CD42), otros componentes proteicos presentes en la membrana son descritos como antígenos plaquetarios, como el sistema PIA que consta de dos antígenos PIA1 y PIA2, otros como el PIE1 y PIE2 se les ha encontrado asociados con púrpura neonatal; por otra parte los lípidos actúan como fuente de fosfolípidos en la activación de los mecanismos humorales de coagulación. La zona submembranosa es abundante en microtúbulos que están constituidos por una proteína denominada tubulina y que forman la estructura fundamental del citoesqueleto gracias al cual se conserva la forma del trombocito, dentro de esta área se

encuentran también microfilamentos contráctiles compuestos principalmente por actina y miocina, además de que los microtúbulos le proporcionan forma a la plaqueta, constituyen un sistema canalicular abierto el cual comunica la parte interna de la plaqueta con el exterior, en estrechísima vecindad se encuentra el sistema tubular denso aparentemente derivado del sistema retículo endoplásmico liso, que muestra positividad con la tinción específica de mieloperoxidasa plaquetaria, lo cual concuerda con la función del metabolismo del ácido araquidónico dentro de la plaqueta, por otra parte se ha hipotetizado que el sistema tubular denso también funciona como una bomba de secuestro de calcio que asegura los bajos niveles de calcio citoplasmático que posee la plaqueta en reposo y que al ser activada se liberan grandes cantidades de este catión (5,6).

La zona sol-gel denominada también hialina o hialoplasma, está compuesta por elementos fibrosos en estructura anular de microtúbulos falsos y de túbulos densos cuya composición es similar a los encontrados en la zona submembranosa, pero varían en el grado de polimerización, esta área le confiere a la plaqueta su forma inalterada cuando se encuentra en estado basal, pero en cuanto alguna sustancia agregante o adherente interactúa con el trombocito, inmediatamente se inicia la llamada metamorfosis viscosa en la que la forma discoide pasa a una estructura de aspecto ameboso que aparentemente tiene que ver con la capacidad de dirigir su propio movimiento y por otro lado, ese cambio de forma le permite contar con una mayor superficie de contacto, dada la contractilidad de la zona sol-gel resulta fundamental durante el proceso de liberación del contenido granular (7).

La zona granular es la parte más interna de la plaqueta y es la que le confiere esa definición colorida con tinciones policromatófilas. Al microscopio electrónico se identifican varias inclusiones, como mitocondrias, gránulos ricos en glucógeno, gránulos alfa y una menor cantidad de gránulos densos. Los alfa contienen diversas proteínas entre las que destacan el fibrinógeno, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor von Willebrand, la tromboglobulina, el factor plaquetario 4; por otra parte los gránulos densos contienen adenosin trifosfato, adenosin trifosfato 5-hidroxitriptamina y calcio (7), (Fig. 2).

ESQUEMA DE LA PLAQUETA

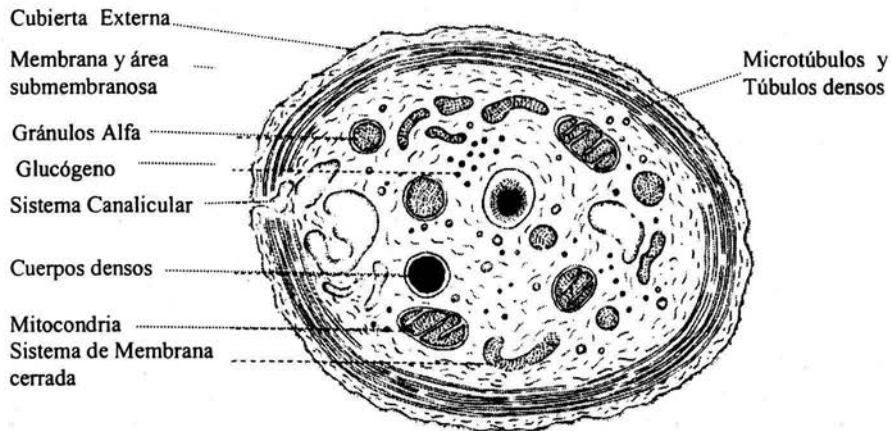


Fig. 2

Acción de las Plaquetas durante la Hemostasia

Las plaquetas constituyen el enlace entre los mecanismos vasculares y humorales de la coagulación, su principal función es la formación de un tapón mecánico cuando existe una lesión vascular. La plaqueta que se encuentra circulando tiene aspecto regular y a medida que se aproxima a la región lesionada se alinean en lo que se conoce como flujo laminar, el primer contacto con el endotelio lesionado provoca en la plaqueta un fenómeno conocido como metamorfosis viscosa, durante la cual el trombocito adquiere aspecto ameboideo y se adhiere a la superficie irregular, la adhesividad plaquetaria se presenta por interacción de la plaqueta con cualquier superficie extraña. En una lesión las plaquetas se adhieren con los grupos amino de las fibras colágenas, para que esta reacción se inicie no es necesaria la presencia de iones de calcio, la unión de la plaqueta con los tejidos subendoteliales expuestos se realiza por medio del factor von Willebrand el cual constituye la mayor parte de la molécula del factor VIII, una parte de esta molécula interactúa con la colágena IV del tejido lesionado y la otra con los receptores de las plaquetas particularmente con la glicoproteína Gp Ib, esta unión provoca liberación del calcio, con lo cual se activa otro componente que participa tanto en la adhesividad como en la agregación de la plaqueta, el complejo glicoproteico IIb/IIIa. Durante estas interacciones se produce liberación de ADP, serotonina, fibrinógeno, enzimas lisosomales y factor neutralizante de la heparina (8,9).

Al iniciarse la fase de liberación sobre todo de ADP y tromboxano A₂ (TxA₂), estos actúan como agregantes de más plaquetas en el sitio de la lesión. El ADP provoca distensión de las plaquetas y estimula a las membranas de las plaquetas adyacentes a adherirse entre sí, durante este evento se requieren iones calcio que forman puentes entre ellas. La propia agregación aumenta la reacción de liberación con lo que se descarga más ADP y TxA₂ lo que conlleva a una agregación secundaria de las plaquetas, esta reacción autogenerada culmina con la formación de un tapón plaquetario lo suficientemente grande para obturar el área de lesión. Dependiendo de la concentración de ADP la agregación puede ser reversible o irreversible, propiedad que se aprovecha como fundamento en las pruebas de agregación plaquetaria (10).

Paralelamente a la salida de ADP se liberan otras sustancias como la serotonina, que es una proteína con actividad vasoactiva que produce una vasoconstricción que comprende una zona importante alrededor del área lesionada, este hecho permite que la presión en ese sitio disminuya y además al disminuir la velocidad de flujo se crea la oportunidad de que los factores denominados de superficie de contacto, se activen (11)

Además del fibrinógeno, los fosfolípidos presentes en las membranas plaquetarias son excelentes promotores

de varios factores de coagulación, ya sea vía superficie de contacto como los factores XII y XI o por el aporte de fosfolípidos que actúan como superficies lipoproteicas simétricas, donde se inicia la activación de los factores IX, X, y protrombina (factor II); la función principal de estos factores activados es la formación de una enzima extremadamente activa denominada trombina cuyo substrato primordial es el fibrinógeno que lo convierte a fibrina, sin embargo, la trombina actúa en otros niveles dentro de los que se incluyen las plaquetas que particularmente las lleva a una mayor agregación (12).

Como puede apreciarse los trombocitos interactúan tanto con los mecanismos vasculares como con los humorales, por lo que una alteración en cantidad o calidad de estos elementos formes pueden desembocar en un evento hemorrágico.

Metabolismo de la Plaqueta

Las alteraciones en la calidad de las plaquetas se asocian con defectos congénitos o adquiridos, algunos de los cuales son poco comunes, pero en general cursan con disfunciones plaquetarias, los defectos adquiridos frecuentemente están relacionados con alteraciones en el metabolismo de las plaquetas y más particularmente con la síntesis de tromboxanos y prostaglandinas a partir del ácido araquidónico.

Para que las plaquetas sintetizen prostaglandinas (PG) es necesario disponer de araquidonato libre. Normalmente la mayor proporción del ácido araquidónico está esterificado en ciertas porciones de los fosfolípidos de las membranas. La prostaglandina sintetasa se encarga de transformar el araquidonato en las endoperoxidasas (PGG₂ y PGH₂), la formación de las primeras moléculas que conducirán a la formación de tromboxanos y prostaglandinas, se inicia con una reacción de bisdisoxigenación, en la cual la enzima ciclooxigenasa inserta dos moléculas de oxígeno en el ácido araquidónico para generar PGG₂, el segundo catalizador es una hidropoxidasa que provoca una reducción para dar PGH₂. A partir de este producto se puede derivar a síntesis de tromboxanos, prostaglandinas o prostaciclina (13), (Fig 3).

METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDÓNICO

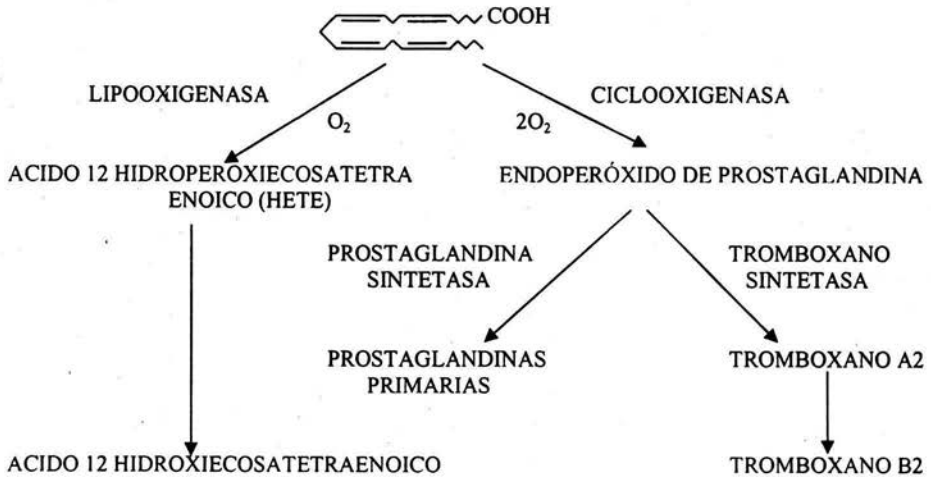


Fig. 3

Al igual que otros sistemas enzimáticos, el metabolismo de la plaqueta puede ser alterado con algunos fármacos, por ejemplo los antiinflamatorios no esteroideos ejercen su efecto sobre la ciclooxigenasa, por lo que no se realiza la inserción del oxígeno, al parecer estos medicamentos compiten con el ácido araquidónico por el sitio activo de la enzima. Por otra parte, la aspirina acetila el residuo de serina del centro activo o un lugar vecino, dicha acetilación no es reversible, con lo que el defecto acompañará a la plaqueta hasta que sea eliminada por el bazo, otros fármacos como la indometacina también inhiben irreversiblemente a la ciclooxigenasa, en tanto que el naproxén lo hace reversiblemente. En cualquiera de los casos si se bloquea esta ruta metabólica, el resultado es una disfunción plaquetaria debido a la disminución en la síntesis de tromboxanos. Cabe mencionar que estas sustancias son poderosos agentes agregantes y al estar bloqueada su producción el paciente es propenso a sangrados o manifestaciones purpúricas. Como puede apreciarse en el esquema, al presentarse un bloqueo medicamentosos en la ruta de síntesis de tromboxanos, es lógico pensar que se incrementa la vía de síntesis del ácido 12 hidroxieicosatetraenoico (HETE) y por tanto su concentración, se sabe que este derivado esta relacionado con actividad quimiotáctica, aún no se han establecido cuales son los

efectos biológicos que cursan con tal situación, pero puede resultar interesante incursionar por ese camino (13,14).

No sólo las plaquetas emplean al ácido araquidónico como sillar, las células endoteliales también lo hacen, pero el resultado en ambos sistemas es antagónico ya que en el endotelio el producto final son las prostaciclina, mientras que en las plaquetas son los tromboxanos, la participación de estos componentes es dependiente de la concentración del adenosil monofosfato cíclico (AMPc).

Las plaquetas son componentes metabólicamente muy activas, desde luego que su bioquímica se modifica cuando se encuentra activada o en reposo, así la glucogenolisis es mayor durante el proceso de adhesividad o agregación, lo mismo sucede con la traslocación del calcio, la fosforilación de proteínas y la producción de AMPc, entre otros (15).

Distribución y Vida Media de las Plaquetas

Cuando se marcan plaquetas con isótopos radiactivos (Cr51) y son transfundidas a personas normales, sólo cerca de dos terceras partes permanecen en circulación, en contraste se menciona que se obtiene casi el 100 % de recuperación en pacientes esplenectomizados, el mecanismo por el cual ocurre secuestro de plaquetas en el bazo no es del todo claro, se ha visto que en pacientes no esplenectomizados a los que previamente se les administró epinefrina los niveles de plaquetas se incrementan hasta un 50 % comparados con los grupos control, otras observaciones relacionadas con el secuestro esplénico han sido que el tiempo de tránsito de la plaqueta es mayor que el de los demás elementos sanguíneos, al microscopio electrónico se ha demostrado que las plaquetas se adhieren a la superficie de las células reticulares en los cordones esplénicos, en condiciones normales este hecho no afecta significativamente la cifra de dichos elementos, pero en enfermedades que se caracterizan por aumento del bazo, la retención de plaquetas puede ser entre el 80 al 90 % del total de la masa plaquetaria y entonces el paciente cursará con trombocitopenia. Son varias las enfermedades que han sido estudiadas en ese sentido,

aunque las más comunes son las hepatopatías, la hipertensión portal, la esplenomegalia congestiva y el hiperesplenismo primario.

La vida media de las plaquetas se ha estudiado también por técnicas con isótopos y se ha establecido que es aproximadamente de 9 días. Los procesos de maduración y fragmentación de los megacariocitos son variables por lo que el resultado será una marcada heterogeneidad en las propiedades incluyendo tamaño y capacidad sintética (16).

Clasificación de los Desórdenes Plaquetarios

Para poder establecer un marco de referencia con respecto al tipo de entidad clínica que son las púrpuras trombocitopénicas inmunológicas, es necesario mencionar la clasificación de los trastornos plaquetarios. Al igual que en cualquier otra patología, éstos pueden ser clasificados como congénitos y adquiridos, éstos a su vez se dividen en alteraciones de calidad y de cantidad (cuadros 1,2 y 3) (7).

El diagnóstico de estas entidades se inicia con la visita al médico a quien el paciente le refiere haber cursado con ciertas manifestaciones hemorrágicas, el clínico detecta básicamente petequias y equimosis, las primeras son lesiones pequeñas, regulares y son el resultado de hemorragias bajo la piel, generalmente están presentes en áreas con alta presión venosa; en tanto que las equimosis pueden ser de varios tamaños y formas, su color varía de rojo, púrpura o azul. El médico realiza la exploración clínica y es posible que establezca un diagnóstico presuntivo. En cualquiera de los casos se apoyará en exámenes de gabinete y de laboratorio.

A pesar de la gran variedad de posibles patologías asociadas con defectos plaquetarios, la mayor incidencia la constituyen las púrpuras trombocitopénicas inmunológicas en los hospitales de concentración hematológica.

CLASIFICACIÓN DE LOS DESÓRDENES PLAQUETARIOS

DESÓRDENES CUANTITATIVOS TROMBOCITOPENIAS

A. Trombocitopenia Causada por disminución en la producción de plaquetas

1. Congénita
 - 1.1. Pancitopenia constitucional (síndrome de Fanconi)
 - 1.2. Trombocitopenia hereditaria
 - 1.3. Infiltración medular (leucemia congénita)
2. Adquirida
 - 2.1. Rubeola neonatal
 - 2.2. Anemia aplásica
 - 2.3. Aplasia megacariocítica
 - 2.4. Infiltración medular (leucemia, carcinoma, mielofibrosis)
 - 2.5. Mielosupresión por drogas
 - 2.6. Trombocitopenia cíclica
 - 2.7. Deficiencia nutricional (vitamina B12 o folatos)
 - 2.8. Hemoglobinuria paroxística nocturna
 - 2.9. Falla renal

B. Trombocitopenia por aumento en la destrucción

1. Congénita
 - 1.1. No inmunológica
 - a. Eritroblastosis fetal
 - b. Preeclamsia
 - c. Síndrome trombocitopénico asociado a hemangioma
 - 1.2. Inmunológica
 - a. Trombocitopenia neonatal isoimmune
 - b. Púrpura trombocitopénica inmunológica materna
2. Adquirida
 - 2.1. No inmunológica
 - a. Infección
 - b. Coagulación intravascular diseminada
 - c. Púrpura trombocitopénica trombótica
 - d. Síndrome urémico hemolítico
 - 2.2. Inmunológica
 - a. Inducida por drogas
 - b. Púrpura postransfusional
 - c. Púrpura trombocitopénica idiopática (inmunológica)

C. Trombocitopenia causada por secuestro plaquetario

1. Hiperesplenismo
2. Hipotermia

D. Trombocitopenia causada por perdida de plaquetas

1. Perfusión extracorpórea
2. Hemodilución por transfusión masiva

Cuadro 1

CLASIFICACIÓN DE LOS DESÓRDENES PLAQUETARIOS

**DESÓRDENES CUANTITATIVOS
TROMBOCITOSIS**

A. Primaria

1. Trombocitemia esencial
2. Otros síndromes mieloproliferativos crónicos

B. Secundaria o reactiva

1. Infección y/o inflamación aguda y/o crónica
2. Anemia hemolítica
3. Hemorragia aguda
4. Postoperatorio
5. Respuesta al ejercicio

Cuadro 2

CLASIFICACIÓN DE LOS DESÓRDENES PLAQUETARIOS DESÓRDENES CUALITATIVOS

A. Congénitos

1. Defectos de adhesión: Síndrome de Bernard-Soulier
2. Defectos en la agregación primaria: Trombastenia de Glanzmann
3. Anormalidades plaquetarias asociadas con otros defectos congénitos
 - 3.1 Trombocitopenia asociada con ausencia de radio: Síndrome de TAR
 - 3.2 Anomalía de May-Hegglin
 - 3.3. Anomalía del tejido conectivo: síndrome de Ehlers-Danlos

B. Adquiridos

1. Uremia
2. Síndromes mieloproliferativos
3. Disproteinemias
4. Enfermedades hepáticas
5. Púrpura trombocitopénica idiopática
6. Inducido por drogas: ácido acetilsalicílico, indometacina, naproxén

Cuadro 3

PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA INMUNOLÓGICA (PTI)

Etiología y Patogénesis

A pesar de que la PTI ya había sido descrita desde 1735, fué Minot en 1916 quién sugirió que la trombocitopenia es debida a una destrucción más rápida que la capacidad que tiene el organismo de formar plaquetas, este hecho se demostró con transfusiones de plaquetas, dichas apreciaciones se confirmaron más adelante mediante el uso de isótopos radiactivos. Posteriormente se observó que los recién nacidos de madres con PTI cursaban también con trombocitopenia, por lo que se elucubró la existencia de un factor humoral capaz de cruzar la barrera placentaria, esta hipótesis se comprobó experimentalmente cuando se administró suero de pacientes con PTI a sujetos sanos provocándoles trombocitopenia aproximadamente al 50 % de ellos. Hacia 1965 se demostró que ese factor humoral causante de la PTI es una inmunoglobulina (7).

Antes del desarrollo de procedimientos que permitieran la identificación de un mecanismo inmunológico, a estas entidades se les reconoció como púrpuras trombocitopénicas idiopáticas, posteriormente se les ha denominado púrpuras trombocitopénicas inmunológicas o autoinmunes. Se define como un trastorno hematológico en el cual se presenta una baja cuenta de plaquetas, mielograma normal y sin evidencias de otra enfermedad. Es importante tener en claro que el mecanismo de eliminación de plaquetas está mediado por una reacción antígeno-anticuerpo, por lo que es posible asociar algunas trombocitopenias inmunológicas con la presencia de algún componente ajeno al organismo (fármaco, toxina, virus) que se adhiere a la superficie de la plaqueta y es capaz de comportarse como un hapteno e inducir la formación de Ac que cada vez que la sustancia ingrese al organismo se producirá trombocitopenia, estas patologías curan espontáneamente o se exacerban dependiendo si el hapteno está presente o no, las PTI en pacientes pediátricos se solucionan favorablemente en la mayoría de los casos, en contraste en el adulto la PTI típica tiene un comportamiento insidioso y rara vez se resuelve espontáneamente, lo cual puede ser explicado mediante un mecanismo de destrucción autoinmune (17).

Manifestaciones Clínicas

En la PTI, la mayor incidencia por edad oscila entre los 20 a 50 años, aunque puede ser vista en personas más jóvenes o más viejas, es también más común en proporción 1 a 3 en las mujeres que en los varones, en la mayoría de los casos no existe algún antecedente relevante. La presencia de síntomas varía de un paciente a otro, pero típicamente la enfermedad se inicia con la presencia de lesiones petequiales insidiosas u otras manifestaciones hemorrágicas menores como menorragia, epistaxis o sangrado de encías, sobre todo después de cepillarse los dientes, estos episodios pueden cursar meses antes de establecerse el diagnóstico, no existen otros datos clínicos relevantes. Las lesiones petequiales o equimóticas pueden ocurrir en cualquier superficie de piel o mucosas, aunque son más comunes en las áreas distales y en las extremidades inferiores, el sangrado de la mucosa oral es indicativo de que la trombocitopenia es muy severa, el bazo eventualmente puede ser palpado con inspiración profunda (17), (cuadro 4).

MANIFESTACIONES CLINICAS DE PTI EN NIÑOS Y ADULTOS

	NIÑOS	ADULTOS
INCIDENCIA		
Edad (años)	2 – 4	20 - 50
Sexo (hombre:mujer)	similar	1:3
Prevalencia por millón	10 – 40	60 – 70
PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD	Agudo (mayores síntoma en la 1a. semana)	Insidioso (mayores síntomas después de 2 meses)
CUENTA DE PLAQUETAS	Menos de 20,000/ul	Menos de 20,000/ul
REMISIÓN ESPONTÁNEA	83 %	2 %
REMISIÓN COMPLETA CON GLUCOCORTICOIDES	--	25 %
REMISIÓN COMPLETA CON ESPLENECTOMÍA	89 %	64 %

Cuadro 4

Hallazgos de Laboratorio

La cifra de plaquetas usualmente está en rangos de 5,000 a 70,000/ul , es común observar plaquetas gigantes y bizarras así como anisocitosis plaquetaria notable, en cuanto a la serie roja, la anemia cuando está presente es debida a la pérdida sanguínea y tiende a microcitosis e hipocromia, es importante realizar una prueba de antiglobulina humana directa (prueba de Coombs), que en caso de ser positiva se debe considerar un probable síndrome de Evans, se ha visto que en la PTI hay un incremento de la fosfatasa ácida, al parecer esto es debido al recambio plaquetario. Las pruebas de función plaquetaria como es de esperarse están alteradas, la retracción de coágulo está disminuída, el tiempo de sangrado es prolongado, la prueba de fragilidad capilar o prueba del torniquete es positiva, estos parámetros de laboratorio resultan modificados por la baja cifra de plaquetas, pero no

es una regla, ya que en algunos pacientes con cuentas entre 30,000 y 50,000 no se alteran las citadas pruebas, pero si en algunos pacientes con rangos entre 60,000 a 80,000/ul, este hecho se puede explicar por la especificidad de anticuerpo, es decir contra cual componente de la plaqueta se une, puede ser una glicoproteína, un componente antigénico o alguna otra estructura que pueda modificar su función o no, en la literatura se reportan autoanticuerpos que producen disfunción en las plaquetas.

La prueba que confirma el diagnóstico de PTI es la determinación de Ac anti-plaquetarios, sin embargo la incidencia de positividad es muy variable de un reporte a otro ya que se reportan casuísticas desde 20 hasta 95 % de positividad de dichos Ac. Tal variación solo se puede explicar por la existencia de un buen número de variantes metodológicas, aspecto que será comentado más adelante.

En la médula ósea los megacariocitos son normales o elevados, pero están menos granulares y mas basófilos ya que no cuentan con el tiempo suficiente de maduración, la destrucción supera a la producción, por lo que los megacariocitos inician la liberación de plaquetas muy prematuramente, de aquí el incremento en el volumen plaquetario medio, en pacientes con PTI se han efectuado algunas determinaciones para demostrar la presencia de Ac anti-plaqueta unidos a los megacariocitos y han resultado positivas, en casos así la trombopoyesis también puede estar alterada.

En el estudio anatomopatológico de bazos extirpados a pacientes con PTI, se muestra gran número de nódulos linfáticos con importante reacción de los centros germinales en la pulpa blanca y un incremento de células plasmáticas alrededor de los pequeños vasos de la zona marginal, todo lo cual sugiere una activa producción de Ac, dado que en el bazo se producen Ac y es ahí también donde el sistema mononuclear fagocítico elimina células desvitalizadas, dentritos celulares o estructuras cubiertas de anticuerpos.

Diagnóstico Diferencial

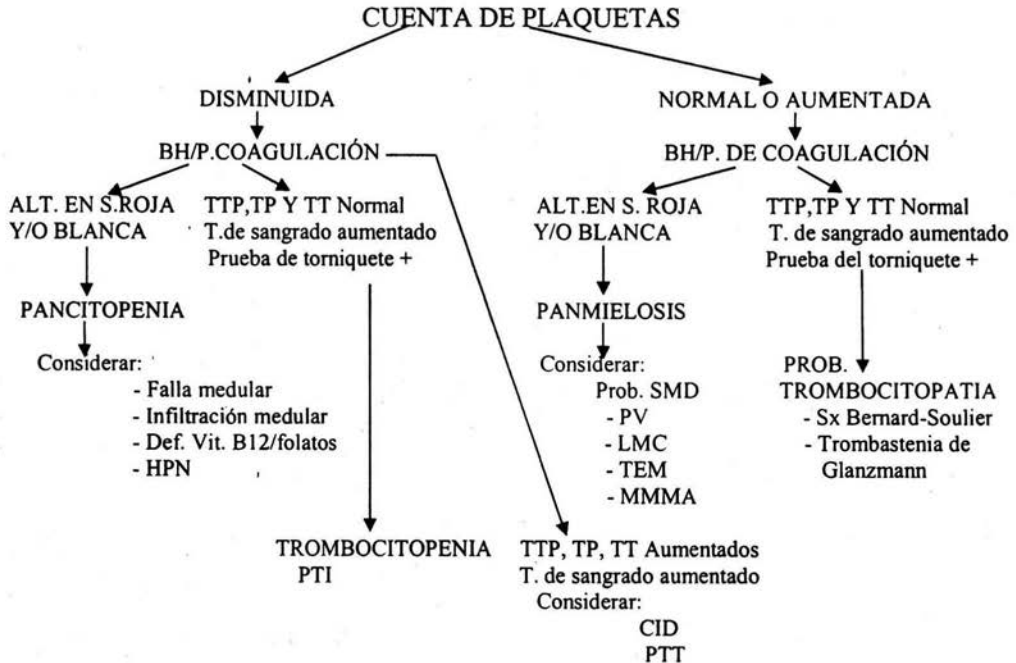
En la tabla relacionada con desordenes plaquetarios se enlista todas las posibles causas que pueden cursar con cuadros clínicos y en ocasiones de laboratorio con PTI, de ahí la

necesidad de precisar el diagnóstico. Es esencial que en toda trombocitopenia se excluyan sensibilidad a drogas, sepsis, coagulación intravascular diseminada, etc. una falla en el reconocimiento de esos desordenes puede ser desastroso. Entre las entidades que posiblemente se deban de considerar en el diagnóstico diferencial estarían los trastornos cuantitativos, particularmente las trombocitopenias y los cualitativos o trombocitopatías.

Como puede apreciarse en los cuadros 1, 2 y 3, son muchas las entidades que deben ser consideradas, por lo que el estudio del paciente con probable púrpura debe ser realizado integralmente, pero es fundamental el abordaje sistematizado. Las pruebas de coagulación (TTP, TP y TT) prolongadas orientan hacia coagulopatías por consumo, el ejemplo típico es la coagulación intravascular diseminada; la morfología eritrocitaria también aporta información en cuanto a la posible entidad clínica, así la presencia de trombocitopenia, pruebas de coagulación normales y eritrocitos fragmentados (esquistocitos) frecuentemente se asocian con púrpura trombocitopénica trombótica y que decir de las pseudotrombocitopenias que se presentan solo como un fenómeno in vitro, al entrar en contacto con el anticoagulante de elección para las biometrías hemáticas, el etilendiamino tetraacetico (EDTA) se produce aglutinación y se obtienen bajos recuentos de plaquetas.

Así se podrían comentar cada una de las patologías y lo importante que resulta el definir perfectamente el diagnóstico, sobre todo por el enfoque terapéutico que el médico aplicará a su paciente trombocitopénico, si la entidad clínica está bien identificada, se evitarán iatrogenias y otras complicaciones. (cuadro 5)

PACIENTE CON MANIFESTACIONES PURPÚRICAS



CUADRO 5

BH biometría Hemática, TTP Tiempo de Tromboplastina Parcial, TP Tiempo de Protrombina, TT tiempo de Trombina, HPN Hemoglobinuria Paroxística Nocturna, SMD Síndrome Mielodisplásico, PV Policitemia Vera, LMC Leucemia mielocítica Crónica, TEM Trombocitemia Esencial Maligna, MMMA Mielofibrosis con Metaplasia Mieloide Agnógena, CID Coagulación Intravascular Diseminada, PTT púrpura Trombocitopénica Trombótica.

Pronóstico

Como ya fue citado en la tabla de manifestaciones clínicas, la remisión espontánea de la PTI es poco frecuente en los adultos, sin embargo hay discrepancias en numerosas revisiones en las que algunos autores mencionan hasta un 20 %, posiblemente estas variaciones sean debidas a la dificultad que implica el establecer el diagnóstico definitivo y también esto permite valorar que los porcentajes de falsos negativos en las pruebas que se emplean para detectar Ac anti-plaqueta no sean reales, sino más bien sea el resultado de un enfoque diagnóstico inadecuado.

Tratamiento de PTI

Este está primeramente orientado a suprimir la actividad inmunológica, para lo cual se emplean glucocorticoides, terapia inmunosupresora, plasmaféresis o gammaglobulina antitímocito. Si las manifestaciones clínicas lo exigen, se recurre a la esplenotomía o a la transfusión de plaquetas.

Tratamiento con Glucocorticoides

A pesar de que no se conoce el mecanismo de acción de estos compuestos, se sabe que suprimen la actividad fagocítica del sistema mononuclear, particularmente del bazo, con lo cual se obtiene un incremento de la vida media de las plaquetas a pesar de estar cubiertas de Ac. Por otra parte, la unión de estos compuestos con los receptores celulares, bloquean la síntesis y liberación de linfocinas y citocinas inhibiendo la acción de los linfocitos T. Los glucocorticoides usados son: cortisol, cortisona, prednisona, prednisolona, dexametasona. Posterior a la administración de prednisona en dosis de 5 mg/día durante dos semanas, se presenta un espectacular incremento de plaquetas, pero al disminuir la dosis, nuevamente hay caída de dichos elementos y en estos casos los protocolos de tratamiento generales justifican la realización de esplenectomía e incremento de la dosis de prednisona, pocos días después, entre el 70 al 90 % de los pacientes presentan un aumento en su cifra de plaquetas hasta llegar a niveles normales (19).

Esplenectomía

La esplenectomía por si sola llega a resolver un buen porcentaje de las PTI, sin embargo el nivel de Ac anti-plaqueta persisten, pudiera pensarse que al no existir un sitio de detección de las plaquetas sensibilizadas, se resolvería el problema clínico, sin embargo, en algunos casos continúa la trombocitopenia y esta es debida a la existencia de bazos accesorios, los reportes de dichos hallazgos están entre el 15 al 20 % de los enfermos, en los que persiste la trombocitopenia a pesar de la esplenectomía. En los pacientes con PTI a los que se les extirpa el bazo además del esperado incremento de plaquetas, hay otros datos en la BH que permiten presuponer si existen o no bazos accesorios, tales hallazgos son los cuerpos de Howell-Jolly y desviación a la derecha de la serie granulocítica (presencia de neutrófilos polisegmentados). El hecho de no detectar esos cambios obliga a pensar en la existencia de

bazos accesorios (19,20). Con la esplenectomía y el tratamiento con glucocorticoides se logra una remisión completa en el 80 al 90% de los casos.

Terapia Inmunosupresora

En algunos casos de PTI el tratamiento con inmunosupresores resulta ser efectivo, sin embargo está reservado para aquellos sujetos que no corrigen con glucocorticoides, el uso de aziatropina, ciclofosfamida vincristina o vinblastina está dirigido contra el sistema linfoide por lo que la producción de anticuerpos disminuye, es posible que la clona responsable de esa respuesta específica sea eliminada, desgraciadamente este recurso terapéutico conlleva riesgos de infecciones por oportunistas, la activación de posibles malignidades o complicaciones neurológicas, por lo que su utilización es poco recomendable (19,21).

Tratamiento con Gamma Globulina

La infusión de gamma globulina en dosis alta produce una respuesta favorable en aquellos casos refractarios a los tratamientos tradicionales, tampoco existe una explicación acerca de los efectos terapéuticos de dicha globulina, aunque al parecer satura los receptores Fc de los fagocitos o quizás por la neutralización de los Ac anti-plaquetas (23).

Plasmaféresis

El objetivo de este procedimiento es el de disminuir los niveles plasmáticos de anticuerpos, básicamente consiste en una máquina de féresis que se encarga de fraccionar los diferentes constituyentes sanguíneos, pudiéndose seleccionar la fracción que interesa separar. En los pacientes con PTI se elimina el plasma con lo que disminuye el título de Ac. Desde luego este recurso no puede ser realizado de rutina, sino que estará reservado para pacientes resistentes a otras terapias (22).

Transfusión de Plaquetas

Este recurso es efectivo en la resolución de un evento hemorrágico, pero no tiene gran utilidad desde el punto de vista profiláctico ya que la vida media de las plaquetas está acortado debido a la reacción con los Ac del paciente, además induce la producción de

isoanticuerpos lo que a mediano o corto plazo limitará las subsiguientes transfusiones de plaquetas (18).

MÉTODOS EMPLEADOS PARA DETECTAR AC ANTI-PLAQUETAS

Como ya fue citado, la trombocitopenia inmune puede ser debida a la producción de autoanticuerpos (como en la PTI), aloanticuerpos (el ejemplo clásico es la púrpura neonatal) o a Ac dirigidos contra drogas. En pacientes adultos la forma mas común es la autoinmune.

El primer autor que trata de desarrollar un procedimiento para detectar los Ac anti-plaquetas, es Harrington quien proporciona una clara evidencia de un factor antiplaquetario circulante. Los métodos iniciales para detectar Ac anti-plaquetas fueron ensayos que de alguna manera valoran la alteración en la función plaquetaria, entre estos se incluían los que median la liberación de algún compuesto como la serotonina o el factor plaquetario 3, otros cuya acción se establecía por inhibición de la agregación o adhesividad plaquetaria, también se menciona la alteración en la retracción del coágulo, sin embargo ninguno de los métodos era lo suficientemente sensible o específico para uso clínico (24).

En 1971 McMillan y colaboradores reportaron que la incubación de plaquetas normales con plasma de pacientes con diagnóstico de PTI producía fijación de Ac, sin embargo no especificaban la manera de medir tal reacción (25). Con el transcurso del tiempo, se logra identificar Ac contra antígenos plaquetarios, particularmente contra el Ag. PAI, en 1982 van Leeuwen estudia los Ac eluidos de plaquetas de pacientes con PTI y demuestra mediante pruebas de agregación plaquetaria, que dichos Ac provocan disfunción en plaquetas normales y se establece que los anticuerpos están dirigidos contra el complejo glicoproteico GpIIb/GpIIIa (26).

A principios de la década de los ochentas se usó por primera vez el ensayo llamado inmunoblot que puede ser traducido como prueba de la mancha cuyo principio se cita más adelante, en 1987 se describen dos nuevos métodos que se basan en la captura o fijación de complejos inmunes, ambas variantes resultan ser de alta sensibilidad en la determinación de

Ac anti-plaquetas, uno de ellos se denomina Inmunobase y el otro Ensayo de Inmovilización Específica de Antígenos Plaquetarios con Anticuerpos Monoclonales o MAIPA de las siglas en inglés Monoclonal Antibody Specific Immobilization of Antigen Assay (27,28).

CAPTURA DE COMPLEJOS INMUNES

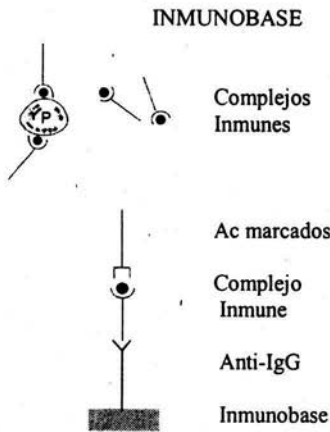


Fig. 4

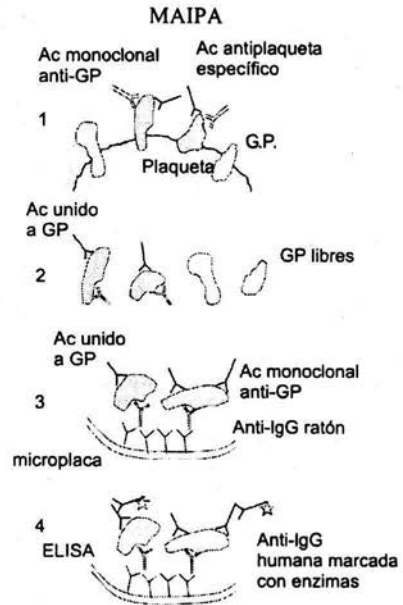


Fig. 5

En el método denominado inmunobase o ELISA, se utiliza la antiglobulina marcada con peroxidasa para detectar anticuerpo. Las plaquetas control, previamente sensibilizadas con el suero problema, se incuban, en microplacas, con la antiglobulina marcada. Después se les añade el sustrato necesario para inducir la reacción de color que se cuantifica espectrofotométricamente. (fig 4)

En la técnica de MAIPA las plaquetas se mezclan con el suero que se va a estudiar y se lavan, una sola vez, antes de ser incubadas con anticuerpos monoclonales específicos para las diferentes glucoproteínas (GP) de la membrana plaquetaria. El sobrenadante obtenido a partir de las plaquetas solubilizadas se deposita en una microplaca previamente recubierta con anticuerpos de ratón. Si en el suero problema hay anticuerpos, el sobrenadante contendrá los complejos inmunes (IC) formados por la unión del anticuerpo monoclonal a

su GP específica, sobre la cual se habrá también fijado el anticuerpo problema. Estos IC se unirán, a través del anticuerpo monoclonal, al fragmento Fab de la antiglobulina de ratón fijada al pocillo de la microplaca. El anticuerpo problema es entonces detectado, tras la adición de una antiglobulina humana marcada con fosfatasa alcalina o peroxidasa y del sustrato de color correspondiente.(Fig 5)

Otro de los métodos también difundido en el uso clínico es el de Inmunoprecipitación, que emplea plaquetas normales incubadas con una solución de biotina amortiguada, lo que permite una mayor expresión de los antígenos plaquetarios, posteriormente se adiciona plasma problema y se incuba, los complejos inmunes se obtienen por ultracentrifugación y son precipitados con la proteína del Streptococcus del grupo A, finalmente la reacción se identifica por electroforesis en gel de poliacrilamida revelado por técnicas de quimioluminiscencia (29), (Fig. 6).

El sustrato para quimioluminiscencia es el dioxetano y la fosfatasa alcalina es la enzima que desestabiliza la molécula por la acción sobre el grupo fosfato, el residuo de dioxetano adquiere una configuración inestable y por reacomodo molecular se produce un éster excitado, este libera la energía almacenada en el anillo dioxetano y es transferida a la fluoresceína y se genera luminiscencia.

REACCION DE QUIMIOLUMINISNCIA

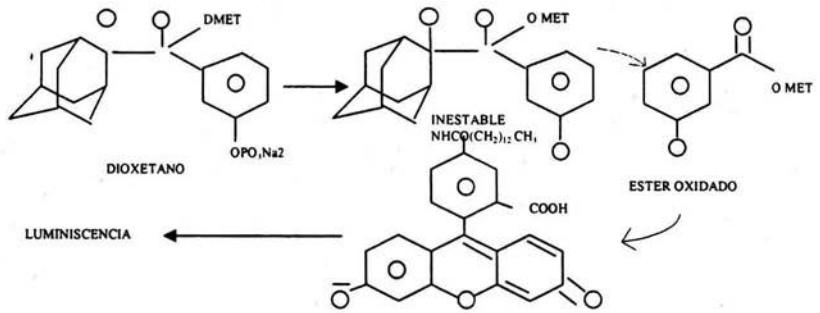


Fig. 6

El último ensayo descrito para detectar Ac anti-plaquetas es el llamado Inmunoblot o prueba de la mancha, a pesar de que este procedimiento ya había sido descrito para otras determinaciones inmunológicas, su aplicación en los pacientes con PTI data de 1993 (30).

ENSAYO DE INMUNOBLOT

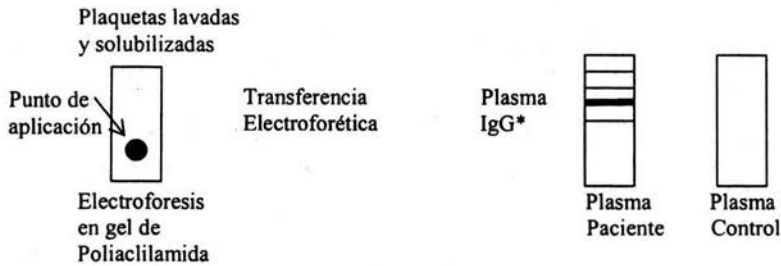


Fig. 7

Las plaquetas lavadas, solubilizadas y corridas electroforéticamente en gel de poliacrilamida son transferidas a un gel de nitrocelulosa y se incuban con el plasma problema, posteriormente se lava y se agrega Ac anti-IgG humano marcado con isótopos o enzimas, si existen Ac anti-plaqueta se obtendrán bandas visibles con el plasma del paciente (Fig. 7).

Como puede apreciarse, existen una gran variedad de ensayos para detectar Ac anti-plaqueta y como es de esperarse cada uno de ellos tiene ventajas y desventajas, aunque se menciona que el MAIPA tiene mas ventajas que los demás métodos, como la rapidez, la reproducibilidad, la posibilidad de manejar grandes volúmenes de muestras, pero al igual que los otros ensayo emplea AcMc y además los sistemas de revelado de la reacción Ag-Ac requieren sistemas enzimáticos, isótopos radioactivos o sistemas de quimioluminiscencia. Por otra parte en la mayoría de esos métodos se realiza manipulación de las plaquetas y es posible que exista modificación antigénica, lo que conlleva el riesgo de falsas negativas.

El procedimiento empleado en el presente estudio se protocolizó en base a una evaluación preliminar de pacientes clasificados como pseudotrombocitopénicos. De los pacientes que acuden al servicio de hematología se incluye a aquellos que por cifras bajas de plaquetas son enviados para identificar la causa de su trombocitopenia, en base al estudio mencionado se realiza de manera rutinaria recuentos de plaquetas empleando heparina como anticoagulante y en varios casos la cifra de plaquetas corrige. Durante el citado estudio se encontraron pacientes que lejos de corregir su número de plaquetas, daban valores mas bajos con heparina que con EDTA, por lo que se pensó en que el paciente tuviese realmente Ac anti-plaqueta y estos se manifestaban con mayor intensidad después de un periodo de incubación.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes:

Se estudiarón 35 pacientes con diagnóstico de PTI que acudieron al Laboratorio Central del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social

Estos pacientes se seleccionaron en base a el diagnóstico con el que eran referidos por el servicio médico de Hematología y por presentar cuentas de plaquetas inferiores a 100,000/ul, en ausencia de otras manifestaciones clínicas o alteraciones en otros parámetros de laboratorio.

Toma de Muestras: .

- 1.- Corroboración en la identificación del paciente y de las solicitudes
- 2.- Aplicar el torniquete o ligadura varios centímetros arriba del sitio de punción, procurando no dejarlo mas de un minuto .
- 3.- Se selecciona una vena adecuada para la punción, se recomiendan las venas de la fosa antecubital, de preferencia la cubital interna.
- 4.- Limpiar la zona de venopunción con una torunda alcoholada
- 5.- Introducir la aguja con el bisel hacía arriba y siguiendo la dirección de la vena, perforar con el extremo opuesto de la aguja el tubo al vacío que contiene anticoagulante (EDTA), otro con Heparina y otro para obtención de suero, simultáneamente mezclar por inversión suave las muestras que llevan anticoagulante, se utilizan tubos del sistema Vacutainer
- 6.- Desligar y retirar la aguja colocando primeramente la torunda en el área de punción.
- 7.- Se le pide al paciente mantenga suavemente presionado el sitio de punción con el fin de que la hemostasia primaria actúe.
- 8.- Se elimina adecuadamente el material empleado para la extracción de sangre.
- 9.- Es recomendable que se procesen las muestras lo mas pronto posible para evitar deterioros en los elementos formes

Método Propuesto

Citología Hemática.- Con la llegada de instrumentos automatizados al laboratorio de hematología ha sido posible incrementar los volúmenes de muestras analizadas, aumentando con ello la precisión, y exactitud. Los recuentos de plaquetas efectuados automatizadamente permiten monitorizar con alto grado de certeza a los pacientes trombocitopénicos. Para la determinación de la BH se utilizó un instrumento de la casa Beckman-Coulter modelo STKS cuyo principio de operación está basado en la denominada triple tecnología, que incluye el análisis por impedancia, dispersión de la luz, y análisis de alta frecuencia.

Las muestras obtenidas de los diferentes pacientes se procesan en el contador de células para obtener la cifra de plaquetas con cada uno de los anticoagulantes, además se realiza el grupo sanguíneo de cada paciente.

Una vez obtenida la cifra de plaquetas se registran y a las muestras con valores inferiores a 100,000/ul se procesan para determinar si tienen o no Ac anti-plaqueta.

1.- Mediante centrifugación a baja velocidad (1800 r.p.m.) se separan los plasmas problema tanto los heparinizados como los anticoagulados con EDTA.

2.- Se selecciona una sangre anticoagulada con EDTA que tenga cifras altas de plaquetas (preferentemente entre 300,000 a 450,000/ul) y que además el grupo sanguíneo de dicha muestra, sea compatible con la del plasma problema. Se utilizan seis tubos para cada paciente, tres con plasma con EDTA y tres con plasma con heparina, cada uno con 0.5ml de plasma.

3.- Se homogeniza la muestra donadora de plaquetas y se mezclan suavemente un volumen de esta mas un volumen de plasma problema con los distintos anticoagulantes.

4.- Inmediatamente se efectúa recuento de plaquetas en el equipo de hematología de un tubo con EDTA y de otro con heparina y se registran los datos, estas cifras corresponden al tiempo 0 de incubación.

5.- Cubrir las mezclas con papel parafilm e incubar un tubo con EDTA y otro con heparina a diferentes temperaturas (4,22 y 37 grados centígrados) durante una hora.

6.- Después de la incubación se procesan nuevamente las muestras en el contador de células y se anotan los resultados.

Simultáneamente se trabajan controles negativos, para ello se utilizaron muestras anticoaguladas con EDTA y heparina de pacientes con cifras normales de plaquetas, después de la incubación los resultados de la cuenta de plaquetas no mostraron variaciones significativas.

En algunos casos se solicitó la realización de Ac anti-plaquetarios (estudio que solo se realiza en el Banco Central de Sangre del mismo Centro Médico) y en otros se consultó el expediente (estudio retrospectivo) y se obtuvo la correlación entre el método propuesto y éste.

A lo largo del desarrollo experimental se observaron pacientes que no presentaban trombocitopenias severas y sin embargo cursaban con manifestaciones clínicas de tipo purpúricas más severas que aquellos pacientes con menor cantidad de plaquetas. Algunos de estos casos fueron seleccionados y se realizaron algunas pruebas de función plaquetaria complementarias (Tiempo de Sangrado, Prueba fragilidad capilar y Retracción del coágulo).

Tiempo de Sangrado (Método de Duke)

1.- Con una torunda alcoholada se limpia el lóbulo de la oreja y se produce una herida con una profundidad de 4 mm y una anchura de 2 mm (con lancetas calibradas).

2.- Tan pronto como la herida sea hecha, poner en marcha el cronómetro, la sangre debe fluir libremente.

3.- Exactamente cada 15 segundos la gota de sangre debe ser adsorbida en un papel filtro, procurando no tocar la superficie de la oreja.

4.- A medida que transcurre el tiempo, se va produciendo el coágulo por lo que la gota de sangre va disminuyendo progresivamente, anotar el tiempo en que se contuvo el sangrado.

Valores de referencia: de 1 a 3 minutos

Prueba de Fragilidad Capilar

- 1.- Seleccionar el brazo, preferentemente que no presente petequias
- 2.- Utilizando un esfigmomanómetro, aplicar una presión promedio entre la sistólica y la diastólica (por ejemplo 100 mm Hg) durante 5 minutos.
- 3.- En caso de que se formen petequias antes del tiempo de presión, se suspende la prueba y se considera positiva.
- 4.- Una vez concluido el tiempo, retirar el esfigmomanómetro y permitir que la circulación se restablezca, lo cual ocurre alrededor de los 5 minutos.
- 5.- Marcar con plumón una área de 3.2 cm de diámetro y contar el número de petequias producidas.

Valores de referencia: Menos de 10 petequias /área

Retracción del Coágulo

- 1.- Empleando el mismo procedimiento de toma de muestras, colocar 5 ml de sangre en un tubo sin anticoagulante e inmediatamente introducir un aplicador (de preferencia de superficie visiblemente irregular), colocar en baño maría a 37 grados centígrados y simultáneamente poner en marcha el cronómetro.
- 2.- Exactamente a la hora retirar con cuidado el aplicador girándolo suavemente, permitiendo que el líquido no atrapado permanezca en el tubo.
- 3.- Medir el volumen de líquido no retraído y calcular su porcentaje.
- 4.- Cálculos el volumen total representa el 100 %, el volumen que permanece en el tubo fue la sangre no retraída, la diferencia entre ambos es el porcentaje de retracción de coágulo.

Valores de referencia: mayor al 60 %

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTIPLAQUETAS

RESULTADOS

PACIENTES	No. DE PLAQUETAS (10*3/ul)							
	BASALES		4° C / 1HORA		22°C / 1 HORA		37°C / 1 HORA	
No.	EDTA	HEPN	EDTA	HEPN	EDTA	HEPN	EDTA	HEPN
1	133	133	135	81	137	68	133	115
2	191	119	195	136	178	60	190	106
3	158	140	159	45	161	57	160	24
4	201	174	205	132	210	162	209	59
5	109	104	115	109	109	97	113	102
6	304	90	315	42	298	60	289	39
7	244	66	267	15	242	85	147	59
8	169	132	143	24	160	96	187	60
9	109	97	107	34	112	102	109	63
10	173	176	186	179	181	179	183	177
11	197	173	204	192	200	178	189	178
12	138	60	97	16	128	65	146	48
13	138	45	111	11	144	28	147	54
14	108	111	110	92	110	102	112	105
15	220	104	235	41	221	99	229	96
16	166	122	167	52	163	111	168	77
17	185	161	186	54	190	128	188	94
18	299	143	302	61	324	122	337	115
19	330	264	323	84	330	108	340	78
20	231	111	233	78	235	106	240	112
21	131	116	128	109	123	117	121	106
22	162	112	148	25	160	107	165	61
23	214	131	212	48	220	115	221	75
24	180	143	183	34	180	124	181	132
25	268	245	279	69	261	77	252	59
26	254	233	241	105	244	87	247	69
27	224	156	227	25	222	65	233	49
28	159	122	148	34	150	86	145	50
29	129	107	119	44	122	82	117	66
30	163	169	176	179	161	166	173	168
31	143	138	147	91	149	78	143	87
32	181	109	185	126	178	50	180	96
33	148	140	147	45	151	57	153	24
34	191	164	205	122	200	152	209	57
35	215	89	220	30	204	84	214	81

Tabla 1

EDTA (Acido etilendiaminotracético)

HEPN (Heparina)

**PORCENTAJE DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE PTI
Y EL ESTUDIO DE Ac ANTI PLAQUETA**

# DE PACIENTES		%
POSITIVOS	29	82.9
NEGATIVOS	6	17.1

TABLA 2

**RESULTADOS DE DETERMINACIÓN DE Ac POR EL MÉTODO
PROPUESTO Y POR CONSULTA DE EXPEDIENTE**

PACIENTE	Ac ANTI - PLAQUETA	
	METODO PROPUESTO	EXPEDIENTE
1	+	+
4	+	+
5	-	-
9	+	+
11	-	-
13	+	+
14	-	-
16	+	+
17	-	+
20	+	+
21	+	-
23	-	+
26	-	-
27	+	+
29	+	+
31	+	+
32	+	+
35	-	+

TABLA 3

**CORRELACIÓN DE CASOS POSITIVOS Y NEGATIVOS
ENTRE EL MÉTODO PROPUESTO Y LA CONSULTA DEL EXPEDIENTE
CORRESPONDIENTE**

		EXPEDIENTE	
		Positivo	Negativo
MÉTODO PROPUESTO	Positivo	10 a	3 b
	Negativo	1 c	4 d
		TOTAL (n) = 18	

TABLA 4

ÍNDICE DE CORRELACIÓN ABSOLUTA (ICA) = $a + d / n$

ICA = 0.77

% ICA = (ICA) X 100 = 77 %

ÍNDICE DE CORRELACIÓN ESPECÍFICA (ICE) = a / n

ICE = 0.56

% ICE = 56 %

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN Kappa (K)

$$K = \frac{P_o - P_c}{1 - P_c}$$

$$P_o = (a + d) / n \quad P_c = [(a + b) / n] [(a + c) / n] + [(b + d) / n] [(c + d) / n]$$

$$P_o = 0.77$$

$$P_c = 0.55$$

$$K = 0.49$$

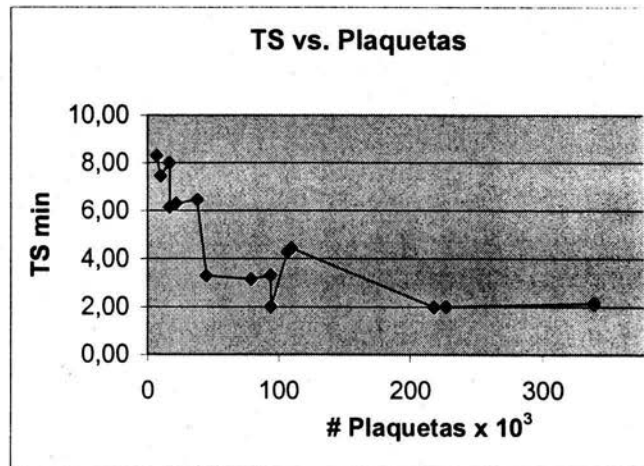
PRUEBAS DE FUNCIÓN PLAQUETARIA

No. PACIENTE	C. PLAQUETAS	T. SANGRADO	R. COÁGULO	P.F. CAPILAR
1	21,000/ul	6.30 min.	64%	+ (>20 petequias)
4	38,000/ul	6.45 min.	38%	-
5	218,000/ul	2.00 min.	64%	-
11	94,000/ul	3.30 min.	50%	-
13	107,000/ul	4.30 min.	36%	-
14	110,000/ul	4.45 min.	37%	-
16	79,000/ul	3.15 min.	53%	-
20	45,000/ul	3.30 min.	40%	-
21	339,000/ul	2.15 min.	68%	-
26	7,000/ul	8.30 min.	6%	-
27	10,000/ul	7.45 min.	5%	-
29	227,000/ul	2.00 min.	10%	-
31	17,000/ul	6.15 min.	25%	-
32	17,000/ul	8.00 min.	70%	-
33	94,000/ul	2.00 min.	55%	-

TABLA 5

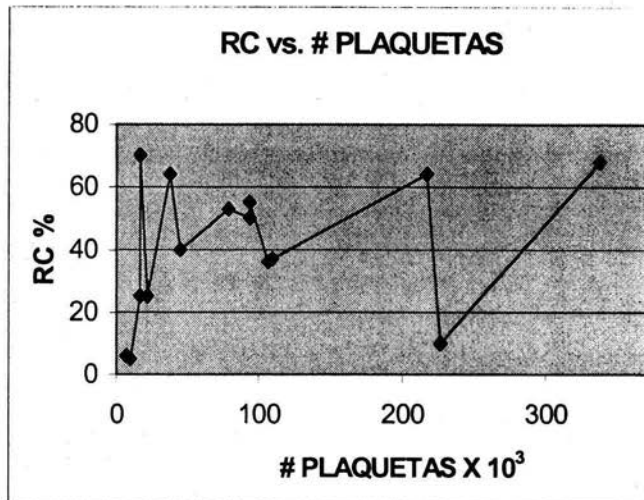
CORRELACIÓN ENTRE TIEMPO DE SANGRADO Y # DE PLAQUETAS

# de Plaquetas	Tiempo de Sangrado
339	2.15
227	2.00
218	2.00
110	4.45
107	4.30
94	2.00
94	3.30
79	3.15
45	3.30
38	6.45
22	6.30
17	6.15
17	8.00
10	7.45
7	8.30



CORRELACIÓN ENTRE RETRACCIÓN DEL COÁGULO Y # DE PLAQUETAS

# de Plaquetas	Retracción del Coágulo
339	68
227	10
218	64
110	37
107	36
94	55
94	50
79	53
45	40
38	64
22	25
17	70
17	25
10	5
7	6



DISCUSIÓN

Como puede apreciarse en la tabla 1 de resultados, 4 pacientes que corresponden al 22 % del total que tenían determinaciones por otra metodología fueron negativos como también por el método propuesto pese a ser manejados como PTI, esto ocurre por la falta de credibilidad de parte del médico a procedimientos de laboratorio complejos que en el mejor de los casos reportan hasta un 20 % de falsas negativas, la inclinación terapéutica se orienta entonces hacia la trombocitopenia inmunológica pese a que no pudo confirmarse plenamente su etiopatogenia. En la consulta del expediente del paciente se encontraron dos casos (5 y 11) en los cuales la determinación de Ac antiplaqueta fue negativa ya habían sido esplenectomizados y la trombocitopenia no fue resuelta.

A diferencia de otros procedimientos, la determinación de Ac antiplaqueta por el método propuesto no valora los Ac unidos a la plaqueta, sólo a los libres en el plasma y esto puede representar una ventaja, ya que al encontrar Ac unidos y negativo en el plasma se establece el diagnóstico de PTI, aunque estos casos pueden ser transitorios ya que generalmente están asociados a fármacos o virus y al suprimir el agente se puede resolver espontáneamente el evento, si bien es cierto que ambas determinaciones son importantes, la utilidad real se centraliza en la trombocitopenia y la demostración de los Ac libres antiplaqueta.

En la tabla 1 puede apreciarse el efecto de la temperatura en el sistema, en la mayoría de los casos los Ac fueron capaces de provocar aglutinación a diferentes temperaturas lo que habla de un amplio rango térmico de actividad, la temperatura de 4 grados mostró en mayor grado de aglutinación y se consideró que la baja temperatura puede promover la agregación plaquetaria no inmunológica por lo que se efectuaron determinaciones paralelas empleando controles negativos como viene citado en la tabla 1, los resultados indican que no ocurre agregación, con lo cual se validan los datos obtenidos en los pacientes.

El rango térmico de acción de un Ac condiciona su efecto clínico, así, un Ac frío prácticamente no ejercerá algún cambio in vivo, un ejemplo de este tipo de comportamiento lo constituye la presencia de aglutininas frías que sólo se manifiestan en el tubo de ensayo ya que el individuo no presenta ninguna sintomatología. Existen otros Ac que son capaces

de manifestarse a diferentes temperaturas y son denominados bifásicos, tanto estos como lo Ac calientes, si tienen repercusiones clínicas, éste es el caso de los Ac antiplaqueta.

Otro aspecto que se consideró en el desarrollo del presente trabajo fue el efecto funcional que los Ac pudiesen tener sobre las plaquetas, la especificidad de los Ac contra Ag. plaquetarios es muy variable, algunos están orientados contra componentes del sistema PIE, otros contra las glicoproteínas Gp y dentro de estos hay también especificidades, no existe pues una tendencia contra algún tipo de Ag. y los datos reportados en la literatura son muy variables, por ejemplo Clancy y col. publican un 82 % de pacientes con PTI cuyos Ac bloquearon alguna función plaquetaria, otros como Cartelazzo con cifras de 37 %. En ambas publicaciones la mayoría de los Ac están orientados contra las glicoproteínas GpIIb/IIIa, Gp Ia/Iia y GpIII.

Para llegar a determinar la especificidad de los Ac es necesario realizar ensayos de Ac antiplaqueta empleando plaquetas provenientes de pacientes con deficiencias hereditarias en algunas de las glicoproteínas (32)

Dada la dificultad de contar con procedimientos accesibles para establecer la especificidad de los Ac anti-plaquetarios, se recurrió a algunas sencillas pruebas de función plaquetaria con el objeto de detectar una posible alteración en su actividad, para ello se efectuaron las pruebas de tiempo de sangrado que permite conocer la capacidad hemostática de las plaquetas y su interacción con fibras de colágena, situación en la que participa el complejo glicoproteico Gp IIb/IIIa, la retracción del coágulo en la que se valora la interacción plaqueta-plaqueta, así como la capacidad de liberación de constituyentes granulares y la prueba del torniquete en el que tradicionalmente se ha aceptado que mide la resistencia vascular, así como la cantidad y calidad de las plaquetas.

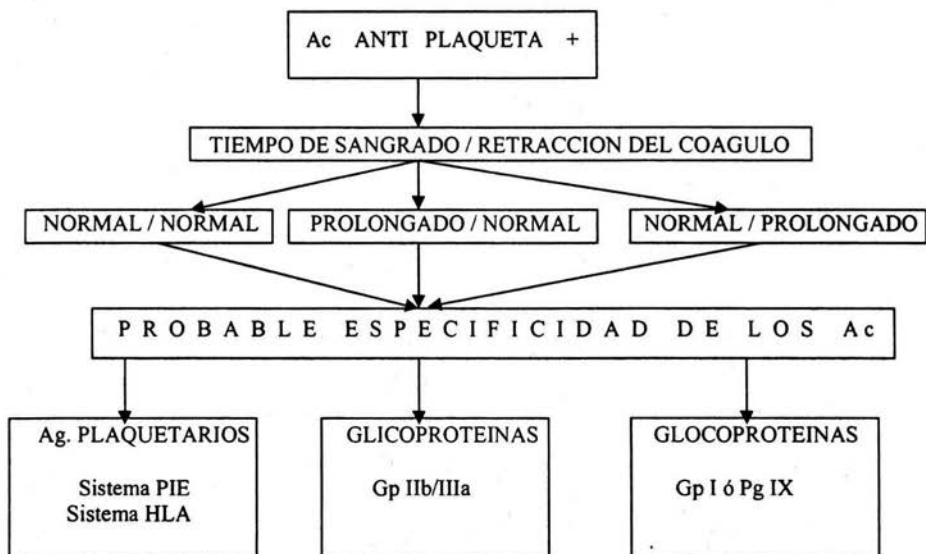
Con respecto al tiempo de sangrado (TS) se sabe que existe una relación inversamente proporcional con el número de plaquetas, esto es cierto si el problema de las plaquetas es sólo de cantidad, así, en los pacientes trombocitopénicos el TS se incrementa en función a la disminución de los citados elementos formes. En el presente estudio el TS resultó mayor

de 3 minutos en el 73 % de los casos y en 4 pacientes fue normal, de éstos sólo uno de ellos presentó plaquetas disminuidas (caso 33).

En cuanto a la retracción de coágulo (RC) 6 de los pacientes estudiados (40 %) dieron porcentajes normales (> 50 %), a diferencia del TS, la RC presenta una mayor correlación entre el número de plaquetas y la mencionada actividad. Llama la atención el caso 29 en el que las plaquetas son de 227,000 y el TS es de 2 minutos, pero la RC está francamente alterada con solo 10 % de actividad, también en dicho paciente los Ac anti-plaqueta resultaron positivos por ambos métodos. La discordancia entre el TS y la RC se puede explicar por la especificidad de los Ac, que como ya se mencionó en el TS se requiere la participación del complejo IIb/IIIa y en la retracción de coágulo la Gp I y Gp IX.

La retracción del coágulo no aportó datos relevantes sino por el contrario resultan cuestionables los resultados obtenidos, puesto que sólo un paciente dió la prueba positiva.

El objetivo del presente trabajo fue el encontrar un procedimiento que no implique grandes recursos tecnológicos o sofisticados, susceptibles de ser incorporados a laboratorios de análisis clínicos de rutina, no debemos olvidar que la PTI es una de las entidades hematológicas de alta frecuencia en la población general y se requiere contar con pruebas que orienten o que confirmen un diagnóstico. A lo largo del desarrollo experimental se obtuvieron algunas observaciones adicionales como el rango de temperatura óptima de acción de los Ac antiplaqueta y el empleo de el tiempo de sangrado y la retracción del coágulo para tratar de obtener la especificidad de los Ac. Al realizar las pruebas de correlación se observa que el método propuesto si cumplió con el objetivo.



ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

- ◆ El procedimiento propuesto para el rastreo de Ac antiplaquetas presenta buena correlación con respecto a los métodos establecidos.
- ◆ Los rangos de temperatura modifican la actividad de los Ac antiplaquetarios, se desaconseja la temperatura de 4 grados porque es posible que ocurran agregaciones espontáneas, aunque esto no fue demostrado en el grupo control.
- ◆ En los pacientes con Ac antiplaquetas es aconsejable realizar algunas determinaciones para medir función plaquetaria y es posible establecer la especificidad de los Ac para que posteriormente se valore si esto se asocia con el pronóstico.
- ◆ La PTI es una entidad de alta frecuencia en la población general, sin embargo su diagnóstico no siempre se confirma con lo que se provocan iatrogenias por los esquemas terapéuticos empleados además de no resolver el problema de fondo. Nuestra obligación como miembros de un equipo de diagnóstico es el de aportar procedimientos, metodologías, recursos o tiempo con el fin de lograr cada vez mayor precisión en los diagnósticos.
- ◆ Finalmente, el procedimiento propuesto demostró su utilidad en la determinación de anticuerpos antiplaqueta y con el apoyo de pruebas como el tiempo de sangrado y retracción del coágulo es posible sugerir la especificidad del anticuerpo. El presente estudio no requirió de reactivos o equipo adicionales a los existentes en cualquier laboratorio de rutina.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Tavassoli, M.: Megakaryocyte-platelet axis and the process of platelet formation y release. *Boob* 55:537. 1980
- 2 Paulus, J.M., Deschamps, J.F., Prenant, M, and Casals, F.J.: Kinetics of platelets megakaryocytes and their precursors: What to measure? *Blood Cells* 6:215, 1980.
- 3 Bithell, T.c., Athens, J.W., Cartwright, G.E., and Wintrobe M.M.: Radiactive diisopropylfluorophosphato as a platelet label: A evaluation of in vitro and vivo techniques. *Blood* 29:354, 1967.
- 4 Radley, J.M., and Scurfield, G.: The meccanism of platelet release. *Blood* 56:996.1980.
- 5 Hovig, T.: The structure of platelets in normal and abnormal states. *Ser .Haematol.* 1: 13. 1968.
- 6 White, J.G., and Clawson, C.C.: Biostructure of blood platelets. *Ultrastruc. Pathol.* 1 :533. 1980
- 7 Williams, J. W. *Hematology* Mc Grae-Hill Book Company a Blakistan publication 1992
- 8 White, J.G., and Krivit, W.: Changes in platelets granules and microtubules during early clot development. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 26:29. 1967
- 9 White, J.G.: Identification of platelet secretion in the electron microscope. *Ser. Haematol.* 6:429. 1973
- 10 Bom, G.V.R.: Uotake of adenosine and of adenosine diphosphate by isolated membrans from human platelets. *J.Biol. Chem.* 249:704. 1974
- 11 Lingjarerde, O.M. Jr: Uptake serotonin in blood platelets: Dependence on sodium and chloride, and inhibition by chlorine. *Am. J. Med.* 3:103.1974
- 12 Bennett, J.S., and Vilaire, G.: Exposure of platelets fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *J. Clin. Invest.* 64:1393.1979
- 13 Stuart, M.J., Gerrard, J.M., and White, J.G.: The influence of albumin an calcium of human platelets arachidonic acid metabolism *Blood* 55:418, 1980
- 14 Catalana, P.M., Smith, J.B., and Murphy, S.: Plateles recovery from aspirin inhibition in vivo: Differing patterns under various assay conditions. *Blood* 57:59. 1981

- 15 Droller, M.J.: Thrombin-induced platelet production of cyclic AMP and a possible intrinsic modulation of platelet function. *Stand. J. Haematol.* 17:167. 1981
- 16 Mezzano, D. Hwong, K.L., Catalana, P., and Aster, R.H.: Evidence that platelet Buoyant density, but no size, correlates with platelet age in man. *Am. J. Hematol.* 11 :61. 1981
- 18 Abraham, J., and Ellman, L.: Platelet transfusion in immune thrombocytopenic purpura *JAMA* 236:1847 1976
- 19 Finch, S.C., Castro, O., Cooper, M. Covery, W., Erickson, R. and Mc Phedran, P.: Immunosuppressive therapy of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am. J. Med* 56: 4, 1974
- 20 Davis, H.H., Varki, A., Andrew, H.A., and Siegel, B.A.: Detection of accessory spleens with Indium 111-labeled autologous platelets *Am. J. Hematol* 8:81, 1980
- 21 Robertson, J.F. Crozier, E.F., and Woodend, B.E.: Vincristine therapy of thrombocytopenics. *N. Engl. J. Med* 292:108, 1975
- 22 Weir, A.B., Poon, M.C., and Mc Gowan, E.J.: Plasma exchange in idiopathic thrombocytopenic purpura, *Arch. Inter. Med.* 140:1 101, 1980
- 23 Schmidt, R.E., Budde, U., Schafer, G., Stroehmann, I.: High dose intravenous gammaglobulin of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Lancet* 2:475,1981
- 24 Mc Millan, R.: Clinical role of antiplatelet antibody assay. *Seminar in Thrombosis and Haemostasis* vol. 1:37,1995
- 25 Mc Miller R., Smith, R.L., Longemire, R.: Immunoglobulins associated with human platelets. *Blood* 37:316, 1971
- 26 van Leewen, E.F., van Derver, J.T.H.: Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia *Blood* 59:23, 1982
- 27 Mc Millan, R., Tani, P., Woods, V.L.: Platelets associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic PTI. *Blood* 70:1040, 1987

- 28 Kieffel, V., Santoso, S.: Monoclonal antibodies-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): A new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood* 70:1722, 1987
- 29 Beardsley, D.S., Spiegel, M.M., Jacobs, R., Lux, S.: Platelet membrane glycoprotein **III** a contain Target antigens that bind antiplatelet antibodies in immune thrombocytopenia. *J. Clin. Invest.* 74: 1701, 1984
- 30 Smith, J. W., Hayward, C. Kelton, J.: Investigation of human platelet alloantigens and glycoproteins using nanoradiative immunoprecipitation, *J. Immunol. Methods*, 158 : 75, 1993
- 31 Deckmyn, H., De Reys, S. Functional effects of human antiplatelet antibodies, *Seminar in Thrombosis and Haemostasis* vol 21, 1,46-59, 1995
- 33 Amiral, J.F., Bridey, M., Dreyfus, A., Vissac, M., Platelet factor 4 complex to heparin the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb. Haemost.* 68:95 - 96, 1992
- 34 Landis, R.J., Kock, G.G., The Measurement of observed agreement for categorical data. *Biometrics*. 33: 159-174, 1977