

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN



**CARACTERIZACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS T EN
PACIENTES ADULTOS CON PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA INMUNE
*DE NOVO.***

TESIS

Que como uno de los requisitos para obtener el grado de
Maestría en Ciencias Quimicobiológicas presenta:

Q.B.P. Gloria Hernández Neri

México, D.F.

Enero, 2010.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de hematopatología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Elba Reyes Maldonado y en el Laboratorio de Hematología Especial del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “La Raza”, bajo la dirección de la Dra. Laura Arcelia Montiel Cervantes.

Agradecimientos

La sustentante agradece el donativo de equipo especializado proporcionado por la "Fundación Gonzalo Río Arante", con el cual se realizó una parte de este proyecto.

A mis directoras de tesis, Dra. Laura Arcelia Montiel Cervantes y Dra. Elba Reyes Maldonado, por su atención y confianza con la que me permitieron realizar este trabajo.

A todo el grupo de trabajo del Laboratorio de hematología especial del Hospital de Especialidades del Centro Médico "La Raza".

A mis maestros

Por su tiempo y dedicación.

Al comité revisor

Dra. Ethel García Latorre, Dra. Martha Cecilia Moreno Lafont, Dr. Jorge Vela ojeda, Dr. Eduardo Ramírez San Juan.

Finalmente agradezco a los pacientes quienes aceptaron participar en este estudio con la confianza de aumentar su esperanza de vida y lograr su curación.

Dedicatorias

A Dios por darme la sabiduría y medios para poder ser fuerte y salir adelante.

A mis padres ya que son parte esencial de mi vida que están siempre para mí sin condiciones, que han sido mis amigos y confidentes y que jamás se rindieron para que yo pudiera siempre seguir adelante, por sus desvelos y consejos este es el resultado de sus esfuerzos.

A mis hijos Andrea sarai Avelar Hernández e Isaari Oliverio Avelar Hernández por su existencia ya que son el motor que impulsa mi vida.

A Ignacio Adrián Avelar Mendoza por la confianza y tiempo que nos ha brindado.

A mi hermano Adrián Fernando Hernández Neri por el apoyo que me dio para escribir este trabajo.

A todas mis hermanas por su apoyo en momentos difíciles de mi vida.

A mis amigas Araceli Mendieta Rerjis y Fabiola Franco Merino por su apoyo en momentos difíciles.

Índice general	Páginas
Índice	<i>i</i>
Índice de Figuras	<i>ii</i>
Índice de Tablas	<i>iii</i>
Abreviaturas	<i>iv</i>
Resumen	<i>v</i>
Summary	<i>vi</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
Justificación	21
Hipótesis	21
Objetivo general	21
Objetivos específicos	21
II. MATERIALES Y MÉTODOS	22
Material biológico	22
Criterios de inclusión	22
Criterios de exclusión	22
Criterios de no inclusión	23
Métodos	24
III. RESULTADOS	26
IV. DISCUSIÓN	40
V. CONCLUSIONES	44
VI. EXPECTATIVAS PARA TRABAJOS FUTUROS	45
VII. BIBLIOGRAFÍA	46
VIII. ANEXO I (Hoja de información y consentimiento del paciente)	50
IX. ANEXO II (Hoja de información y consentimiento del donador)	51
X. ANEXO III (Fórmulas para realizar las conversiones de los porcentajes obtenidos).	52

Índice de figuras	Páginas
Fig No.1. Patogénesis de la púrpura trombocitopénica autoinmune.	7
Fig No.2. Paciente con petequias en miembro superior izquierdo	9
Fig No.3. Paciente con equimosis en miembro superior derecho.	9
Fig No.4. Respuesta inmune adaptativa.	16
Fig No.5. Comparación de las medianas de edad para donador sano vs PTI <i>de novo</i> .	26
Fig No 6. Determinación de células CD3, CD4, CD8, NK, NKT en una muestra de sangre periférica de un paciente con PTI <i>de novo</i> .	27
Fig No.7. Determinación de células NKT invariantes en una muestra de sangre periférica de un paciente con PTI <i>de novo</i> .	28
Fig No.8. Determinación de células T reguladoras en una muestra de sangre periférica de un paciente con PTI <i>de novo</i> ..	29
Fig No.9. Determinación de células dendríticas tipo1 y 2 en una muestra de sangre periférica de un paciente con PTI <i>de novo</i> .	30
Fig No.10. Comparación de las medianas para células NK entre donadores sanos vs PTI <i>de novo</i> .	32
Fig.No.11. Comparación de las medianas para células NKT entre donadores sanos vs PTI <i>de novo</i> .	32
Fig.No.12. Comparación de las medianas para células CD3 $\gamma\delta$ entre donadores sanos vs PTI <i>de novo</i> .	33
Fig.No.13. Comparación entre las medianas para células NKTi entre donadores sanos vs PTI <i>de novo</i> .	33
Fig.No.14. Comparación de las medianas para células T reg entre donadores sanos vs PTI <i>de novo</i> .	34
Fig.No.15. Comparación de las medianas para células DC1 entre donadores sanos vs PTI <i>de novo</i> .	34
Fig.No.16. Comparación de las medianas para células DC2 entre donadores sanos vs PTI <i>de novo</i> .	35

Fig.No.17.	Comparación de las medianas para células CD19 entre donadores sanos vs PTI <i>de novo</i>	35
Fig.No.18.	Comparación de las medianas para las células NKT entre donadores sanos vs PTI <i>de novo</i> vs PTI Tx	37
Fig.No.19.	Comparación de las medianas para las células CD3 $\gamma\delta$ entre donadores sanos vs PTI <i>de novo</i> vs PTI Tx	37
Fig.No.20.	Comparación de las medianas para las células NKTi entre donadores sanos vs PTI <i>de novo</i> vs PTI Tx	38
Fig.No.21.	Comparación de las medianas para las células T reg entre donadores sanos vs PTI <i>de novo</i> vs PTI Tx	38
Fig.No.22.	Comparación de las medianas para las células DC2 entre donadores sanos vs PTI <i>de novo</i> vs PTI Tx	39
Fig.No.23.	Comparación de las medianas para las células CD19 entre donadores sanos vs PTI <i>de novo</i> vs PTI Tx	39

Índice de tablas	Páginas
Tabla No.1. Datos clínicos presentes en pacientes con PTI.	9
Tabla No.2. Causas de trombocitopenias secundarias.	10
Tabla No.3. Cifras de plaquetas para realización de procedimientos.	19
Tabla No.4. Valores de las Medianas y Percentiles a 25%-75% obtenidos de la comparación de pacientes vs donadores.	31
Tabla No. 5. Resultados de la comparación de las medianas de los diferentes marcadores estudiados por el análisis de Kruskal – Wallis.	36

Abreviaturas

AMO	Aspirado de Médula ósea
BCR	receptor de células B
DC1	Célula dendrítica T 1(Mieloide o Monocitoide)
DC2	Célula dendrítica T 2(Linfoide o Plasmocitoide)
DS	Donador sano
FvW	Factor de Von Willebrand
GP IIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
GP V	Glicoproteína V
HLA	Antígeno leucocitario humano
IFNg	Interferón gama
Ig	Inmunoglobulina
IL-2	Interleucina tipo 2
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NK	Natural Killer
NKT i	Células NKT invariantes
PTI	Purpura Trombocitopenica Idiopatica
PTI n	Purpura Trombocitopenica Idiopatica <i>de novo</i>
PTI Tx	Purpura Trombocitopenica Idiopatica con tratamiento
Tc	Linfocitos citotóxicos
TCR	receptor de células T
Th	Linfocitos cooperadores
TPO	Trombopoyetina
T reg	Células T reguladoras

RESUMEN

La púrpura trombocitopénica autoinmune (PTI) es una enfermedad en la cual el diagnóstico se sigue realizando por exclusión de otras patologías. Se caracteriza por la producción de anticuerpos habitualmente de la clase IgG, contra las glicoproteínas IIb/IIIa de la superficie de las plaquetas, provocando eliminación prematura de éstas por las células del sistema fagocítico (SF), siendo el bazo el principal sitio de eliminación. El objetivo del presente trabajo fue determinar las subpoblaciones linfocitarias T, B, y células dendríticas en pacientes con PTI *de novo* (PTIn) y posterior a tratamiento. Para ello, se estudiaron 15 pacientes con diagnóstico de PTI n con una mediana de edad de 43 años, en un intervalo de 35 – 51 años. Diez pacientes (66.6%) fueron mujeres y 5 (33.3%) hombres. Como grupo testigo se analizaron 20 donadores sanos (DS) del banco de sangre, con una mediana de edad de 34 años, (intervalo de 29.7 – 38.9 años), 15 (75%) mujeres y 5 (25%) hombres. De cada individuo se obtuvieron 3mL de sangre heparinizada en etapa basal (antes de iniciar tratamiento) y después de recibirlo a los 3 meses (PTI Tx). A partir de estas muestras se cuantificaron células nucleadas, linfocitos y plaquetas totales, por otro lado se ajustaron 1×10^6 células/100µL, para determinar las poblaciones linfoides CD3, CD4, CD8, NK, NKT, NKTi, T reg, DC1, DC2 y CD19 por citometría de flujo, utilizando anticuerpos monoclonales específicos acoplados a fluorocromos. A partir de los resultados obtenidos en porcentaje se determinaron los valores absolutos de cada una de las poblaciones y con ello se realizó el análisis estadístico. Se encontraron diferencias significativas en la comparación de las medianas de la cuenta celular entre DS vs PTI n como se describe a continuación, para la cuenta plaquetaria, células NK, NKT, CD3γδ, NKTi, T reg, cantidad mayor en los pacientes con PTI n en comparación con DS ($P < 0.05$) en las células DC1, DC2, CD19 con una cantidad menor en los pacientes con PTI n que en DS ($P < 0.05$). A los tres meses posteriores al tratamiento con prednisona, se analizaron las mismas poblaciones celulares encontrando que se normalizaron los valores de las diferentes poblaciones celulares afectadas como es el caso de células NK, NKT, NKTinv, CD3γδ y T reguladoras, CD2, CD19 ($P > 0.05$). En los pacientes con PTI *de novo* el sistema inmune se ve afectado en algunas subpoblaciones linfocitarias tanto del tipo B como T las cuales se normalizan con el tratamiento inmunosupresor.

Abstract

Autoimmune thrombocytopenic purpura (ITP) is an hemorrhagic disease in which diagnosis is made after exclusion of other entities causing thrombocytopenia. In the majority of cases of ITP, there is an IgG antibody that is directed against IIb/IIIa glycoproteins on platelet surfaces, a phenomenon that promotes platelet destruction by spleen macrophages. The objective of this work was to determine different lymphocyte subsets (T, B, NK, NKT, Tregs, and dendritic cells) in patients with de novo ITP, before and after treatment with steroids. We included in the study 15 patients [10 (66.6%) female and 5 (33.3%) male] with ITP with a median age of 43 years (95% CI 35-51 years), and 20 healthy donors [15 (75%) female and 5 (25%) male] with a median age of 34 years (95%CI 29.7-38.9 years). We obtained 3 mL of heparinized peripheral blood from all individuals, before and three months after treatment. Lymphocyte subsets were analyzed by flow cytometry using a FacsCalibur cytometer (Beckton Dickinson). For comparison between lymphocyte values of patients and normal donors, we used the Mann-Whitney U test, and for comparisons between ITP patients before and three months after treatment, we used the paired T test. Patients with ITP had higher values of NK, NKT, gamma-delta, and t regs cells in comparison to normal donors. By contrast, the values of DC1, DC2 and CD19+ B cells were lower in ITP patients. After three months of treatment with steroids, the number of all lymphocyte subsets was normalized, especially in NK, NKT, gamma-delta, and Treg cells. In conclusion, the number of lymphocyte subsets in patients with de novo ITP is abnormal, a finding that is normalized after at least three months of treatment with steroids.

I. INTRODUCCIÓN

La púrpura asociada con “la fiebre pestilente” se describió inicialmente por Hipócrates, pero no fue sino hasta el siglo XVI que se retomó por Lusitanus, y en la primera mitad del siglo XVII, La Riviere la identificó en ausencia de fiebre (Jones y Tocantis 1933). En 1735, Gottlieb, describió una paciente joven con petequias, equimosis y hemorragias en membranas mucosas, con una recuperación espontánea y completa y le dio el nombre de “morbus maculosus hemorrhagicus”. En 1808, Willan clasificó la púrpura con el nombre de *simplex*, *hemorrágica urticans* y contagiosa. La disminución de “hematoblastos” (plaquetas) en la púrpura hemorrágica fue observada por Graus en 1833 y 100 años después, Hayem describe la trombocitopenia como causa de la enfermedad. Finalmente fueron Harrington y Shulman los que establecieron entre 1950 y 1960, que la púrpura trombocitopénica inmune (PTI) es un trastorno autoinmune en el cual las plaquetas sensibilizadas son destruidas en el sistema reticuloendotelial, y de forma notoria, en el bazo. Dixon y Rosse en 1975, iniciaron la caracterización de los autoanticuerpos y desarrollaron pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la enfermedad, midiendo la “IgG asociada a las plaquetas” de estos pacientes. Van Leewen y col. (1982), mostraron que las plaquetas de pacientes con trombocitopenia de Glanzmann (deficientes en GP IIb / IIIa), no reaccionaban con estos autoanticuerpos. Esta entidad sigue siendo material de estudio, ya que el origen de este trastorno inmune sigue sin explicarse (Karparkin, 1985; Cines y cols., 2002). Es así como la púrpura trombocitopénica inmune (PTI), se designa como un proceso que cursa con trombocitopenia aislada, con un número normal o aumentado de megacariocitos en la médula ósea, sin otra enfermedad o alteración subyacente, tales como infección viral o bacteriana, ni a la acción de tóxicos químicos o medicamentos. El mecanismo patogénico fundamental se debe a la producción de autoanticuerpos dirigidos contra las glicoproteínas de superficie de las propias plaquetas y, a la eliminación prematura y selectiva de las plaquetas cubiertas por anticuerpos por parte de las células del sistema fagocítico (SF), siendo el bazo el principal lugar de eliminación. La trascendencia de este órgano en la fisiopatología de la (PTI), no sólo se debe al sitio donde se eliminan la mayor parte de las plaquetas, sino a que es además, una de las fuentes de producción de anticuerpos ((Stasi y cols., 2004).).

Los antígenos plaquetarios contra los cuales se forman los anticuerpos en la PTI, probablemente están presentes en los complejos GPIIb/IIIa (que se une al fibrinógeno y ADP provocándoles cambio de forma, agregación y secreción plaquetaria), GpIV (receptor para trombospondina y colágena tipo I), y GpV (receptor de trombina que es un agregante plaquetario). La respuesta inmune en esta enfermedad se caracteriza porque en la superficie plaquetaria se encuentran moléculas de IgG que se alteran siendo digeridos por el sistema fagocítico (SF). Asimismo, hay una buena relación entre la cantidad IgG adherida a la plaqueta y la vida media plaquetaria, así como con la respuesta al tratamiento (Cines y cols., 2002).

El calificativo de idiopática o primaria, se sigue utilizando para definir a aquellos casos en los que la PTI, se asocia con otro proceso con el que generalmente, comparte una misma patogenia, en cuyo caso se denomina PTI secundaria o asociada. La etiología, el perfil clínico y, especialmente la evolución de la enfermedad en el adulto, difieren sensiblemente de las del niño (Karparkin, 1985).

A diferencia de las formas infantiles, el mecanismo patogénico de la PTI en el adulto es autoinmune, los pacientes suelen requerir tratamiento y el proceso tiende a convertirse en crónico, por lo que se le ha denominado también PTI crónica; no obstante, tanto desde el punto de vista clínico como de la evolución y pronóstico, en el adulto también se utiliza la expresión PTI aguda para referirse a la forma recientemente diagnosticada y en general, la de PTI crónica para referirse a la trombocitopenia presente una vez que han transcurrido seis meses después del diagnóstico (Pujol-Moix, 2002).

Se ha descrito que el 50% de los pacientes adultos con (PTI) presentan cuenta plaquetaria menor a 10,000 plaquetas totales, con alto riesgo de hemorragia interna, sangrado gingival y petequias (Cines y cols., 2002).

Las trombocitopenias inmunológicas pueden clasificarse según su mecanismo patológico, el agente desencadenante o la duración de la enfermedad. La trombocitopenia inmunológica transitoria también es una complicación de algunos casos de mononucleosis infecciosa, toxoplasmosis aguda, citomegalovirus, hepatitis viral y la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La PTI aguda es rara en los adultos y representa menos de 10% de los casos pospuberales de trombocitopenia inmunitaria. La PTI aguda se origina por la presencia de inmunocomplejos formados por antígenos únicos que se han unido a los receptores Fc de las plaquetas, o por anticuerpos formados contra los antígenos virales y que presentan reacciones cruzadas con las plaquetas. Además de los trastornos vírales antes citados, el diagnóstico diferencial debe hacerse con las formas atípicas de la anemia aplásica, las leucemias agudas o los tumores metastásicos. Es esencial realizar un examen de la médula ósea para excluir estos trastornos que en ocasiones se parecen a la PTI aguda (Cines y cols., 2002).

La mayoría de los adultos presenta una forma más insidiosa de trombocitopenia, que puede durar años, se conoce como PTI crónica y afecta con más frecuencia a las mujeres entre 20 y 40 años de edad, en una proporción de 3:1, en relación a los hombres (Herrik-Frederiksen 1999), puede comenzar con un descenso brusco en la cifra de plaquetas, lo que produce hemorragias, de forma parecida a la PTI aguda. No obstante, con frecuencia existen antecedentes previos de sangrado fácil con los roces o metrorragias. Estos pacientes presentan un proceso autoinmune con anticuerpos que se dirigen contra los antígenos situados en el complejo de la glicoproteína IIb-IIIa o de la glicoproteína Ib-IX (Kuwana y cols., 2003). Aunque la mayoría de los anticuerpos actúan como opsoninas y aceleran la eliminación de las plaquetas por las células fagocíticas, algunos anticuerpos se unen a los epitopos situados en regiones críticas de estas glicoproteínas y deterioran la función plaquetaria (George y cols., 1998).

Se han introducido varias pruebas para medir la IgG asociada a las plaquetas, aunque existen pocas situaciones clínicas en las que es necesario su estudio (Cines y cols., 2002).

Clasificación.

La PTI se clasifica en función del tiempo de evolución en aguda, cuando la duración es menor de 6 meses y crónica cuando ésta tiene más de 6 meses de evolución después del diagnóstico. La importancia de determinar si es aguda o crónica, se asocia fundamentalmente con la evolución de la enfermedad. Por ejemplo, en los niños, 70% de los casos son agudos y habitualmente ocurre después de un evento infeccioso, donde tiene un curso autolimitado (Calpin y cols ,1998). En contraste, en la población adulta, la mayor parte de los casos tienden a una evolución crónica (Henrik-Fredericsen y cols., 1999).

Se denomina PTI crónica refractaria cuando el paciente no responde a la esplenectomía y mantiene una cuenta de plaquetas por debajo de $20-30 \times 10^9/L$ y requiere de otras modalidades de tratamiento (Tarantino, 2002). También la enfermedad se divide en:

- Púrpura trombocitopénica inmune o idiopática.
- Trombocitopenia inmune secundaria (a lupus eritematoso generalizado, y otras).
- Trombocitopenia inducida por medicamentos.
- Trombocitopenia relacionada a infección viral (Chong y cols., 2005).

Epidemiología.

La incidencia general se calcula entre 1 y 12.5 casos por 100,000 personas/año (Henrik-Frederiksen 1999). Estas cifras pueden ser mayores; sin embargo, no existen estudios epidemiológicos que estimen la incidencia real de la enfermedad, incluso muchos casos de PTI aguda en niños no reciben atención médica especializada por lo que no se documentan.

- Género: en niños la prevalencia es la misma entre hombres y mujeres; sin embargo, en adultos la relación mujer-hombre es de 3:1.
- Edad: en los niños la enfermedad puede afectar a cualquier edad, siendo el pico de prevalencia entre los 3 y 5 años. En los adultos la mayor incidencia se presenta entre los 15 y 40 años, sin embargo, un estudio realizado en Dinamarca encontró que el promedio

de edad era de 56 años con incremento progresivo después de los 60 años (Herrik-Frederiksen y cols., 1999).

Mortalidad y morbilidad.

La primera causa de morbimortalidad de la PTI es la hemorragia, espontánea o postraumática constituye la principal causa de muerte cuando la cuenta de plaquetas es menor de $10^9/L$. La mortalidad al momento del diagnóstico es del 1.5%, sin embargo, en pacientes con menos de $30 \times 10^9/L$ plaquetas en los primeros dos años es 4.2 veces mayor (Johanna y cols., 2001). La morbimortalidad asociada al tratamiento es ocasionada por las complicaciones generadas por la esplenectomía, el empleo de esteroides o el uso de andrógenos o inmunosupresores a mediano y largo plazo que provoca el tratamiento de la PTI crónica que es recurrente o resistente (Chong y cols., 2005).

Fisiopatología.

Las manifestaciones de la enfermedad son consecuencia de la destrucción precoz de las plaquetas al estar unidas a anticuerpos específicos del mismo paciente, de forma tal que dichos inmunocomplejos van a ser captados por la fracción Fc de los macrófagos del sistema fagocítico (SF), principalmente del bazo, lo que producirá su destrucción (Kasnelson 1916). La gravedad de la trombocitopenia es el reflejo del balance entre la producción de plaquetas por los megacariocitos y su destrucción acelerada, demostrada mediante técnicas radiactivas con Cr^{51} o Indio 111 sobre las propias plaquetas (Aster y cols., 1969). En la PTI aguda los anticuerpos se producen como respuesta normal a la infección desencadenante, estos anticuerpos posiblemente presentan una reacción cruzada con las plaquetas o con los propios megacariocitos, acelerando su lisis. En la forma crónica, los anticuerpos se dirigen contra las glicoproteínas de la membrana plaquetaria y es en esta forma, donde se detectan con mayor frecuencia títulos altos de anticuerpos y la recurrencia es más elevada (Valverde y cols., 1997). Esto se dedujo de las observaciones realizadas en recién nacidos de mujeres afectadas con la enfermedad, quienes desarrollaban trombocitopenia transitoria. Además, dichas observaciones fueron confirmadas sobre el fundamento de la presencia de

trombocitopenia transitoria en voluntarios sanos, a quienes se les transfundía plasma de individuos afectados con la enfermedad y en estos disminuían sus cuentas plaquetarias. Así, estos autoanticuerpos son principalmente de la clase IgG y ocasionalmente IgM e IgA y están presentes entre 50 y 70% de los pacientes. Los autoanticuerpos que reaccionan contra las plaquetas, se unen principalmente a las glicoproteínas GPIIb /IIIa, aunque también a otros antígenos, como Ib / IX, Ia / IIa, IV y V, así como a otros determinantes antigénicos. De hecho, es típica la presencia de anticuerpos contra múltiples antígenos. Así, las plaquetas opsonizadas con los autoanticuerpos IgG tienen una depuración acelerada por el sistema fagocítico mononuclear, a través de los receptores Fc expresados sobre la superficie de los macrófagos tisulares, principalmente del bazo e hígado (Karpatin y cols., 1985).

La destrucción de las plaquetas dentro de las células presentadoras de antígenos, puede generar una sucesión de neoantígenos que resulta en una producción suficiente de autoanticuerpos que ocasionan la trombocitopenia. Los anticuerpos son generados por una sola clona de células B, mediado por un antígeno específico, bajo el control de las células T cooperadoras (Th) y las citocinas que ellas producen como: Interleucina (IL-2), interferón gamma (IFNg) y reducción de IL-4 e IL-5 (Roark y cols., 2002, Chong y cols., 2000). Los pacientes adultos con PTI tienen linfocitos T HLA-DR (+), presentan incremento en la cantidad de receptores para IL-2 y un perfil de citocinas que sugieren la activación de precursores de linfocitos Th1. En la PTI las células T estimulan la síntesis de anticuerpos después de la exposición a fragmentos de glicoproteínas IIb-IIIa. Estos hallazgos sugieren que estos antígenos que inician la respuesta autoinmune alteran las proteínas plaquetarias, o bien, las infecciones virales o bacterianas pueden mimetizar estos péptidos plaquetarios. Se desconoce cómo y cuándo las proteínas plaquetarias son alteradas o la razón de la expresión de antígenos criptogénicos y de la activación sostenida de los linfocitos T (fig No. 1) (Martínez Murillo y cols., 2007).

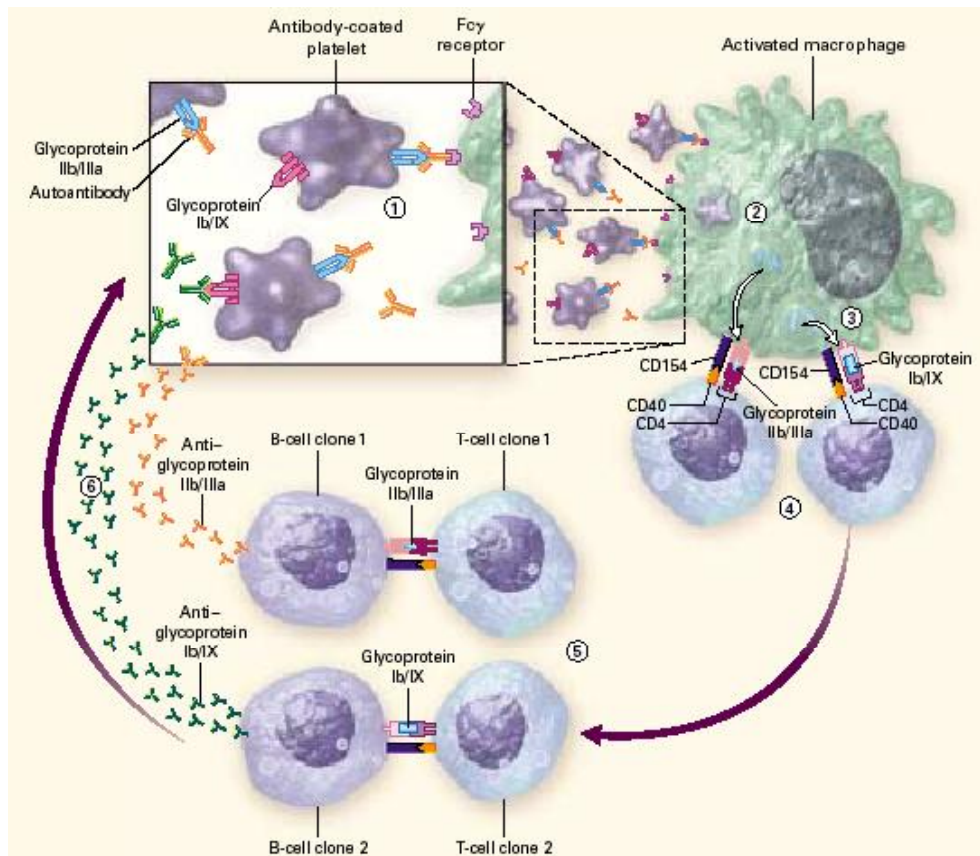


Figura No 1. Patogénesis de la PTI. Los factores que inician la producción de anticuerpos son desconocidos. La mayoría de los pacientes tienen anticuerpos contra varias glicoproteínas de la superficie plaquetaria en el momento en que se hace evidente clínicamente la enfermedad, la glicoproteína IIb/IIIa es reconocida por auto anticuerpos (Naranja), mientras que los anticuerpos que reconocen el complejo glicoproteína Ib/IX no han sido generados en esta etapa (1). Las plaquetas cubiertas de anticuerpo se ligan a las células presentadoras de antígeno (macrófago o células dendríticas) a través de receptores $Fc\gamma$ y son ingresadas y degradadas (2). Las células presentadoras de antígeno no solo degradan la glicoproteína IIb/IIIa (azul claro oval) mientras se amplifica la respuesta inmune inicial, sino que también se pueden generar epítopes de otras glicoproteínas plaquetarias Ib/IX (cilindros azul claro) (3). Los linfocitos T activados (4), expresan receptores para estos nuevos péptidos en la superficie celular con ayuda coestimuladora (representada en parte por la interacción entre CD154 y CD40) las citocinas relevantes que facilitan la proliferación de las clonas iniciales de células T CD4+ (clona 1 de células T) y estos con especificidades adicionales (clona 2 de células T) (5). Los receptores de inmunoglobulinas de células B que reconocen antígenos plaquetarios adicionales (clona 2 de células B) son mientras tanto inducidas también para la proliferación y síntesis de anticuerpos antiglicoproteínas Ib/IX (verde). (Tomado de Douglas, 2002).

Se han identificado algunas familias con mayor predisposición para desarrollar enfermedades autoinmunes, específicamente PTI; incluso, se ha diagnosticado la enfermedad en gemelos

monocigotos; sin embargo, estas observaciones no han sido reproducibles en la mayoría de los casos con la enfermedad. En relación con los antígenos de histocompatibilidad, se ha observado incremento en la prevalencia en ciertas poblaciones de los alelos HLA-DRw2 y DRB1. El antígeno HLA-DR4 se ha asociado con respuesta favorable, en contraste, la presencia de DRB1 se asocia con respuesta desfavorable. Por otra parte, el antígeno HLA-DRB1 ha asociado con pobre respuesta a esplenectomía (British 2003).

Diagnóstico

Es importante considerar para el diagnóstico de la enfermedad la sintomatología, la evolución de la misma y los datos clínicos asociados. La forma aguda de la enfermedad es la presentación característica en los niños a diferencia de los adultos, en quienes tiene un inicio insidioso y habitualmente no le precede una infección viral u otra enfermedad infecciosa. Los signos y síntomas son muy variables y puede ir desde presentaciones asintomáticas, pacientes con hemorragias mucocutáneas hasta hemorragias activas en cualquier sitio (**Tabla No.1**) (Stasi y cols., 2004). En los pacientes con cuenta de plaquetas por arriba de $50 \times 10^9/L$, el diagnóstico de la PTI es incidental debido a que no presentan sintomatología hemorrágica. Por otro lado, los enfermos con cuenta de plaquetas entre 30 y $50 \times 10^9/L$ tienen petequias y equimosis al mínimo trauma; en contraste, los enfermos con cifras de plaquetas de 10 a $30 \times 10^9/L$, presentan petequias, equimosis, epistaxis, gingivorragias y/o metrorragias espontáneas (**Tabla No.1 y Fig 2 y 3**). Aquellos con cifra de plaquetas menor a $10 \times 10^9/L$ tienen un riesgo alto de hemorragias internas, incluyendo hemorragias en órganos vitales, como en el sistema nervioso central.

Tabla 1. Datos clínicos presentes en pacientes con PTI.

DATOS CLÍNICOS
<ul style="list-style-type: none">• Petequias• Equimosis• Gingivorragia• Hemorragia Conjuntival• Hemorragia retiniana• Hematuria• Hemorragia de tubo digestivo• Esplenomegalia• Hemorragia en Sistema Nervioso Central

Manifestaciones clínicas de algunos pacientes con púrpura trombocitopénica autoinmune.



Figura No. 2. Paciente con PTI que presenta equimosis en el miembro superior derecho.



Figura No.3. Paciente con PTI que presenta petequias en el miembro superior izquierdo.

El diagnóstico de la PTI todavía sigue efectuándose por exclusión de otros trastornos que ocasionan trombocitopenia. Los estudios que se solicitan al paciente deben ir orientados a descartar la presencia de otras enfermedades o infecciones que ocasionan la trombocitopenia, como hepatitis virales, enfermedades autoinmunes, afecciones tiroideas y

otras (**Tabla 2**). Las presentaciones secundarias pueden asociarse con otros trastornos como: lupus eritematoso generalizado, linfomas, hepatitis, etc (Cine y cols., 2002).

Tabla 2. Causas de Trombocitopenia secundaria.

Enfermedades Inmunológicas:
•Lupus eritematoso generalizado
•Artritis reumatoide
•Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAAF)
•Enfermedades tiroideas autoinmune
Infecciones:
•Virus de inmunodeficiencia humana
•Virus de hepatitis C
• Citomegalovirus

La duración de la hemorragia puede ayudar a distinguir entre la forma aguda y la crónica de la PTI, además, la ausencia de síntomas sistémicos apoya la ruta diagnóstica hacia una PTI primaria. La historia familiar es importante porque distingue entre formas hereditarias como la púrpura trombocitopénica cíclica familiar, de la verdadera PTI (Cines y cols., 2002).

Pruebas de laboratorio

Biometría hemática. Se marca la presencia de una cuenta baja de plaquetas y habitualmente, el resto de los parámetros hematológicos se encuentran dentro de la normalidad, sin embargo, en algunos pacientes pueden evidenciarse otros trastornos como la presencia de anemia normocítica normocrómica que puede ser secundaria a la misma hemorragia, o microcítica hipocrómica asociada a deficiencia de hierro o a padecimientos inflamatorios crónicos. En algunos enfermos puede observarse anemia macrocítica que puede estar asociada a datos de deficiencia de hematínicos o a anemia hemolítica con reticulocitosis (Cine y cols., 2002, British, 2003).

Es importante la verificación del resultado de la cuenta de plaquetas mediante el análisis del frotis de sangre periférica para descartar pseudotrombocitopenia asociado a EDTA (0.1% de los adultos), trombocitopatías asociadas a plaquetas gigantes u otros defectos hematológicos. En la PTI pueden observarse macroplaquetas o megatrombocitos, que son plaquetas inmaduras. Estas plaquetas jóvenes, también denominadas reticuladas, pueden ser detectadas por citometría de flujo (Cine y cols., 2002, British, 2003).

Aspirado de médula ósea (AMO). La realización del AMO en los pacientes con PTI es controversial, sin embargo, las guías publicadas por la Sociedad Americana de Hematología (American Society of Hematology, ASH) (Henrik, 1999), proponen que en adultos de menos de 60 años con presentación típica de la enfermedad puede evitarse el AMO. Aunque, otros autores sugieren que el AMO se realice a edad mayor a 40 años. Por otro lado, en los niños se sugiere no realizar AMO si se encuentra bajo vigilancia y tratamiento con dosis altas de inmunoglobulina endovenosa, excepto en caso de otras alteraciones hematológicas y presentación atípica (British C. 2003)

Detección de anticuerpos antiplaqueta. La prueba de inmunofluorescencia se emplea para investigar la presencia de anticuerpos unidos a las plaquetas (PAIgG). El análisis directo de la medición de los anticuerpos unidos a las plaquetas tiene sensibilidad estimada de 49 a 66% con especificidad del 78 a 92%, y valor predictivo positivo del 80 al 83% (Cine y cols., 2002, British, 2003). Por otro lado, la detección de anticuerpos libres en plasma es de menor utilidad debido a su mayor variabilidad interlaboratorio y su menor sensibilidad y especificidad (British, 2003).

El incremento en los niveles de IgG asociada a plaquetas (PAIgG) puede ser detectada en muchos pacientes con PTI, pero los resultados no son lo suficientemente sensibles o específicos (algunas infecciones pueden cursar con resultados falsos positivos), para el uso rutinario de estas pruebas en pacientes con la sospecha de PTI (Cine y cols., 2002).

El resultado negativo de la prueba no descarta el diagnóstico de la enfermedad y la prueba no es de utilidad para distinguir entre la forma primaria o secundaria, o para detectar a los pacientes que evolucionarán a la fase crónica. La determinación de anticuerpos específicos

contra las glicoproteínas plaquetarias GPIIb/IIIa y GPIb/IX menos sensible (50-65%) pero más específica (90%). El empleo de estas pruebas puede ser de utilidad en casos complejos donde existe duda en el diagnóstico y pueden auxiliar a determinar si se trata de un trombocitopenia inmune o no inmune. No deben ser empleadas de rutina (Cine y cols., 2002).

La investigación de autoanticuerpos plaquetarios debe emplearse en los siguientes casos:

- Presencia de síndrome de falla medular en combinación con trombocitopenia probable de origen inmune.
- Trombocitopenia inmune dependiente de drogas.
- Falla a múltiples tratamientos (después de la segunda línea de tratamiento).
- Pacientes con trombocitopenia asociada a enfermedades como; leucemia linfocítica crónica, postrasplantados, gammapatías monoclonales, etc.

Determinación de trombopoyetina (TPO). La determinación de la trombopoyetina puede ser de utilidad en casos complejos, específicamente para distinguir entre trombocitopenia con pobre producción medular (niveles normales de TPO). Sin embargo, la determinación no debe realizarse como rutina, sólo en casos especiales para investigación (Cine y cols., 2002).

Plaquetas reticuladas. La medición de RNA plaquetario por citometría de flujo refleja el incremento en la producción plaquetaria asociada a la PTI, particularmente en niños en comparación con otras causas de trombocitopenia. El papel del análisis de las plaquetas reticuladas no se ha establecido y por lo tanto, no se recomienda su determinación en el momento actual (Cine y cols., 2002).

Dado que la PTI es un padecimiento que tiene origen autoinmune es importante saber qué función tiene la respuesta inmune celular y la autoinmunidad.

Respuesta Inmune: Los linfocitos B se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos que se unen al antígeno en el medio extracelular y activan mecanismos del antígeno dependiente de anticuerpos.

Los linfocitos T se originan en médula ósea y maduran en el timo (tolerancia central). En este órgano se genera al azar el receptor de células T (TCR), por el cual estas células son capaces de reconocer las moléculas propias del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los posibles TCR seleccionados son los que reconocen a los HLA propios de cada individuo, a este proceso se le denomina selección positiva y es con el fin de rescatar a los linfocitos T inmaduros útiles. Esto se lleva a cabo en la corteza del timo con la ayuda de células presentadoras de antígeno (APC), que muestra a los linfocitos T inmaduros, moléculas accesorias para anclarse y moléculas de histocompatibilidad de clase I y II (**Fig No 4**). Los linfocitos T inmaduros que no son capaces de reconocer a las moléculas de histocompatibilidad propia morirán por apoptosis (Mondino y cols., 1996). Los linfocitos T inmaduros expresan CD4 y CD8 simultáneamente en su membrana además del complejo $TCR\alpha\beta$. El $TCR\alpha\beta$ puede tener afinidad por la molécula MHC de clase I o de clase II. Los linfocitos T cuyo TCR tiene afinidad por moléculas de clase I dejarán de expresar la molécula CD4 y conservarán al CD8, y los linfocitos T con afinidad por clase II dejarán de expresar la molécula CD8 y conservarán al CD4 (Mondino y cols., 1996).

Por otro lado, la tolerancia de los linfocitos T en la periferia (tolerancia periférica), es aquella que actúa sobre las clonas de las células T autoreactivas que escapan de la selección negativa del timo, u originada *de novo* contra antígenos propios. Así mismo, la tolerancia periférica se lleva a cabo por varios mecanismos como la eliminación o anergia. Adicionalmente (Mondino 1996).

Las células NK derivan principalmente de linfocitos granulares de gran tamaño que constituye cerca del 5% de todos los linfocitos humanos en sangre periférica. La mayoría de las NK son: $CD3^-$, $CD16^+$, $CD56^+$, $CD94^+$, poseen cierta capacidad de reconocer y destruir células infectadas por virus, reconocen a células que no pueden expresar moléculas MHC de

clase I, y también emplean diversos receptores para reconocer a su objetivo de forma positiva (por ejemplo puede unirse al anticuerpo ya ligado al antígeno sobre una célula diana mediante sus receptores Fc [CD16] – proceso conocido como citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo.

Las células NK y las células dendríticas son reclutadas hacia el sitio del tumor. Las células NK se activan y secretan interferón ($\text{IFN}\gamma$) lo cual aumenta su capacidad citolítica. La destrucción de las células mediadas por NK libera cuerpos apoptóticos, cuerpos necróticos y proteínas de choque térmico, lo cual produce activación de las células dendríticas las que a su vez secretan IL-12 aumentando la actividad citolítica de NK y la producción de $\text{IFN}\gamma$ (Moretta A 2002).

Otras células importantes son las NKT. Estas, a diferencia de las células T, expresan el receptor el receptor de NK (NK1.1 ó CD161) y al TCR. Existen cuatro variedades de estas células, pero una de las más importantes (células NKT invariante NKTi) las cadenas $V\alpha 24 - V\beta 11$. Estas células, en lugar de reconocer y unirse a las células que expresen las moléculas de MHC, reaccionan con células que expresen CD1d (molécula parecida a MHC). En el surco de CD1d en lugar de presentar un péptido, presenta glicolípidos del tipo α galactosil – ceramida. Estas pueden ser positivas a CD4 ó dobles negativas (CD4-, CD8-) y son y son de gran importancia por su potente actividad antitumoral, la cual regulan al actuar en conjunto con las células NK, células dendríticas y linfocitos T (Wilson, 2003). La interacción entre las células NKT, dendríticas y NK, inicia por medio del estímulo de las NKT por α galactosil – ceramida. Estas células CD 40L el cual se une a CD40 de las células dendríticas, estimulándose la producción de IL-12 por estas últimas. Las células NKT producen $\text{IFN}\gamma$, lo cual incrementa la posibilidad de una mayor producción de IL-12 provocando en las células NKT: A) liberación de IL – 4 e IL10 (que es el freno de este mecanismo), B) secreción de IL-13 y C) mayor producción de $\text{IFN}\gamma$, aumentando la citotoxicidad por parte de las células NK (Brutkiewics, 2002).

En el humano existen dos tipos principales de células dendríticas (DC) en la medula ósea y en la sangre periférica: DC1, mieloides o monocitoides las cuales generalmente son Lin-HLA-DR+CD11c+ y DC2, linfoide o plasmocitoide que son Lin-HLA-DR +CD123+ (CD123 es el

receptor de IL-3)(MacDonald, 2002). Las DC son las células más eficientes en presentación de antígenos.

A mediados de los 90`s una subpoblación de células T que expresan la cadena α del receptor de alta afinidad para la IL-2 (CD25), se convirtió en el centro de atención para los inmunólogos interesados en la inmuno regulación, estas células T CD4+CD25+ llamadas reguladoras o supresoras, juegan un papel central en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y la autotolerancia (Fontenot, 2003).

En 1995 Sakaguchi demostró finalmente que la molécula llamada CD25 era un marcador seguro. Cuando en estudios de ratón, él quitaba las células T CD4+ que expresaban la molécula CD25, en órganos tales como gónadas, páncreas, tiroides, las células blancas llegaban bajo un ataque auto inmune caracterizado por inflamación; estas células blancas invadían los órganos (Sakaguchi, 2006).

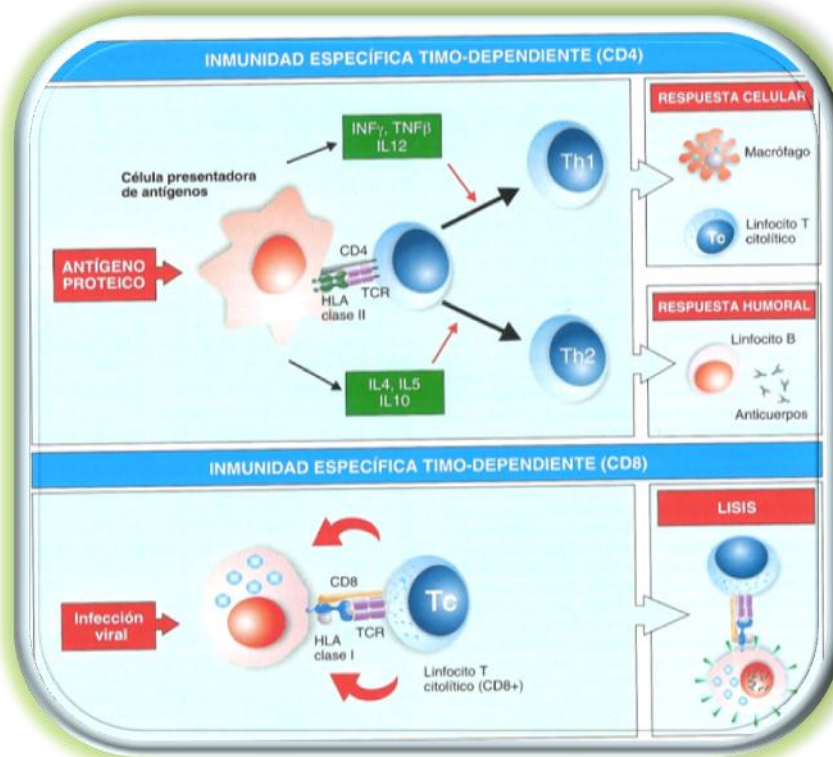


Figura No.4. Respuesta inmunitaria adaptativa. Los diferentes tipos de patógenos evocan diferentes respuestas inmunitarias adaptativas. Los patógenos intracelulares que viven en el citoplasma de la célula huésped (por ejemplo virus) inducen una respuesta mediada por linfocitos T citotóxicos que lisan a las células infectadas. La respuesta humoral se dirige contra patógenos extracelulares que son eliminados gracias a los anticuerpos producidos por los linfocitos B. La respuesta celular o inflamatoria está mediada por linfocitos cooperadores Th1 que favorecen la destrucción del microorganismo fagocitado por los macrófagos. Este tipo de respuesta es imprescindible para controlar las infecciones de patógeno (Regueiro y cols, 2006).

Autoinmunidad.

La inmunidad adaptativa cumple con la función de defender al organismo ante un agente infeccioso, sin embargo, esta respuesta inmune puede causar daño tisular y enfermedad denominada “enfermedad por hipersensibilidad”. El objetivo de la respuesta inmune es la eliminación del agente agresor sin causar daño al tejido huésped pero, en ocasiones, esta respuesta se sale de control o se enfoca en un blanco no apropiado del tejido hospedero causando enfermedad. Una de éstas es la autoinmunidad, en la que hay un fallo de los mecanismos normales de la auto tolerancia dando lugar a reacciones contra células y tejidos propios (Bach, 2005); Hoy en día se sabe que muchas de las enfermedades por

hipersensibilidad están mediadas por los linfocitos Th 1, y que en ellas los linfocitos T producen directamente inflamación o estimulan directamente la síntesis de anticuerpos que lesionan los tejidos que inducen inflamación (Marrack P y col., 2001).

Se conoce que el evento más importante en el desarrollo de la autoinmunidad es el reconocimiento de antígenos propios por linfocitos autoreactivos, los cuales sufren activación, proliferación y diferenciación hasta transformarse en células efectoras que son las que provocan el daño tisular así como sus productos. El cómo falla la autotolerancia y el por qué se activan los linfocitos autoreactivos, son las interrogantes en autoinmunidad y probablemente sea la base de la patogénesis de esta enfermedad (Davidson 2001., Marrack., 2001).

La prevalencia de las enfermedades autoinmunes en los Estados Unidos de Norteamérica es de 2 – 5% de la población y a pesar de los avances en la investigación, la etiología de la mayoría de ellas permanece obscura y su entendimiento sigue siendo un gran reto para la inmunología (Davidson 2001., Marrack., 2001).

De los conceptos que han surgido a lo largo de las investigaciones en este tema queda claro que:

- La autoinmunidad es el resultado de una falla o fracaso de los mecanismos responsables del mantenimiento de la autotolerancia de las células B y T o ambas. El potencial para la autoinmunidad existe en todos los individuos porque durante su desarrollo, los linfocitos pueden expresar receptores específicos para antígenos propios que pueden acceder al sistema (Good Now y cols., 2005).
- La predisposición genética y los agentes ambientales como infecciones, son factores que contribuyen al desarrollo de la autoinmunidad. La infección y el daño tisular modifican la forma en que los antígenos propios se exponen al sistema inmune, con la consecuente falla en la auto tolerancia (Good Now y cols., 2005).
- Las enfermedades autoinmunes pueden ser específicas de órgano o sistémica y hay participación de complejos inmunes.

- El inicio de reacciones autoinmunes contra antígenos propios puede resultar en la liberación y alteración de otros antígenos de los tejidos; esta circunstancia puede provocar la activación de linfocitos específicos exacerbando la enfermedad (Davidson y cols., 2001, Bach 2002, Good now 2005).

La PTI pertenece al grupo de enfermedades producidas por anticuerpos, éstos se pueden enlazar a antígenos de células particulares o de tejidos extracelulares, o bien, forman complejos antígenos – anticuerpo en la circulación, que se depositan en las paredes de los vasos sanguíneos. En la práctica clínica la enfermedad se demuestra mediante la detección de los anticuerpos o complejos inmunes en la circulación o depositados en los tejidos. Los anticuerpos dirigidos contra células o matrices celulares producen enfermedades locales y no sistémicas.

Generalmente éstos son autoanticuerpos aunque, pueden ser producidos contra antígenos exógenos que despiertan una reacción inmunológica cruzada con algún componente del tejido propio (Davidson y cols., 2002; Marrack y cols., 2001).

Tratamiento

Es importante distinguir el criterio para el tratamiento de la PTI que depende fundamentalmente de la presentación clínica, la cuenta de plaquetas y la evolución de la enfermedad. Los adultos habitualmente requieren tratamiento al inicio de la enfermedad, debido a que la mayoría de ellos se presentan con cuenta de plaquetas entre $30 - 50 \times 10^9/L$. Salvo en algunos casos especiales en los cuales requiere la realización de procedimientos invasivos, **Tabla 3**. (British., 2003, Pizzuto y cols., 1984).

Tabla 3. Recomendación Británica de cifras plaquetarias necesarias
Para la realización de procedimientos.

Situación clínica	Cifra de plaquetas
Tratamiento dental	> o = $10 \times 10^9/L$
Extracción dental	> o = $30 \times 10^9/L$
Bloqueo dental regional	> o = $30 \times 10^9/L$
Cirugía Menor	> o = $50 \times 10^9/L$
Cirugía Mayor	> o = $80 \times 10^9/L$
Parto vaginal	> o = $50 \times 10^9/L$
Cesárea	> o = $80 \times 10^9/L$
Anestesia epidural	> o = $80 \times 10^9/L$

Se ha diseñado una escala de hemorragia que permite evaluar de forma objetiva el grado que presenta un paciente, independientemente de la cuenta plaquetaria. En un estudio realizado en Francia se utilizó para decidir que pacientes con cuentas plaquetarias < de $20 \times 10^9/L$ debían ser tratados urgentemente con inmunoglobulina endovenosa y esteroide (puntaje > 8) y quienes podían ser tratados sólo con esteroide (puntaje < o = 8), inclusive de forma ambulatoria. Con esta escala se pudo utilizar esteroide como monoterapia en 73% de los pacientes sin observarse episodios hemorrágicos graves en este grupo y pudo evitar el uso de inmunoglobulina hasta en 50% de los pacientes con plaquetas menores de $20 \times 10^9/L$ (Kellaf y cols., 2005).

Además debe administrarse inmunoglobulina endovenosa, en dosis 1g/kg de peso por día durante 2 días, bolos de metilprednisona 1g/día por 3 días y transfusión de plaquetas (5U cada 4-6 h o 2 U/h). La transfusión debe reservarse para casos de extrema urgencia o previo al procedimiento con alto riesgo de hemorragia (Stasi y cols., 2004, Mead y cols., 2003).

Corticosteroides. Habitualmente, se utiliza prednisona de 1 a 2 mg x kg/día (60mg/m²/SC) durante 4 – 6 semanas. Puede utilizarse también dexametasona a dosis de 40 mg al día por vía oral (Warkentin y cols., 1990). El porcentaje de respuesta varía ampliamente, del 50 al 75% con incremento en la cuenta de plaquetas en las primeras dos a tres semanas de tratamiento, sin embargo, después de la respuesta inicial las recaídas son comunes cuando se reduce la dosis del medicamento.

Por otra parte, se ha demostrado que no existe diferencia en el porcentaje de respuesta entre los siguientes esquemas de tratamiento; prednisona 0.4 g/ kg/día por 5 días ó 1 g/ kg en dosis única. El mecanismo de acción involucra varios efectos como bloqueo de receptores Fc del sistema fagocítico mononuclear, bloqueo en la unión de anticuerpos y disminución en la producción de autoanticuerpos (Cheng 2003).

Justificación.

Debido a que en México actualmente no se cuenta con datos acerca de las subpoblaciones linfocitarias en la sangre periférica de los pacientes con PTI antes de recibir tratamiento, y dado que éstas se modifican sustancialmente con el manejo, consideramos que es trascendente obtener este conocimiento para entender e inferir con mayor claridad la fisiopatología y los mecanismos de acción de los esquemas terapéuticos actuales.

Hipótesis.

- Las subpoblaciones linfocitarias de estirpe T en pacientes con PTI de *novo* difieren en cantidad con respecto a la población sana.

Objetivo.

- Determinar las subpoblaciones linfocitarias T, B, monocitoide y de células dendríticas en sangre periférica (SP) de pacientes con PTI *de novo*.

Objetivos específicos.

- Determinar las subpoblaciones linfocitarias CD3, CD4, CD8, CD19, CD16 + CD56, Lin1-CD11c+HLADR+, Lin1-CD123+HLADR+, CD3 $\gamma\delta$, CD3 $\alpha\beta$, T reguladoras en sangre periférica de pacientes con PTI *de novo* y donador sano.
- Evaluar las mismas poblaciones celulares en los pacientes con PTI *de novo* tres meses posteriores al tratamiento.
- Comparar las subpoblaciones al inicio y después del tratamiento para evaluar la efectividad del mismo.

II. Materiales y métodos

Material biológico.

- Muestras de sangre periférica (SP) obtenidas de pacientes con diagnóstico de PTI *de novo* y de donadores sanos, proporcionados por el Banco de sangre del Centro Médico Nacional “La Raza”, IMSS.

Criterios de inclusión

Pacientes

- Pacientes con PTI *de novo*
- Mayores de 16 años de edad
- Género masculino y femenino
- Sin diabetes, enfermedad hepática, renal o lupus
- Sin infección por el VIH, VHC, VHB
- Consentimiento informado por escrito.

Testigos sanos

- Hombres y mujeres mayores de 18 años
- Donadores de sangre sanos que acudan al Banco de Sangre.
- Consentimiento informado por escrito.

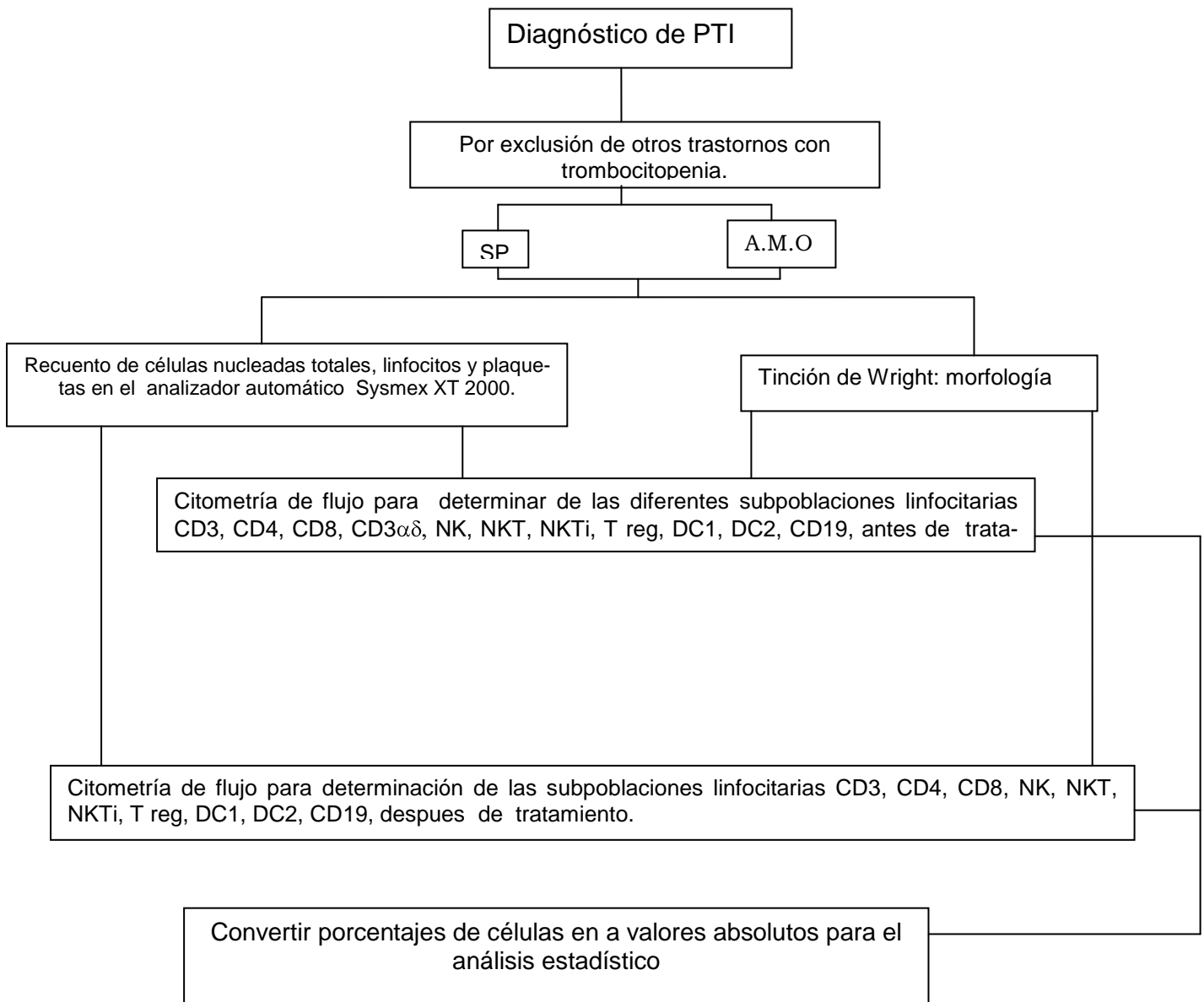
Criterios de exclusión

- Que el paciente no acepte participar en el estudio.
- Que el paciente haya recibido tratamiento.

Criterios de no inclusión

- Mujeres embarazadas.
- Lactancia.

Diagrama de flujo



Métodos.

Determinación de los diferentes subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo en el citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA, USA)

a.1. Preparación de las muestras para el análisis cuantificación de células nucleadas ($10^6/\mu\text{L}$)

b.1. Tinción:

Para determinar los marcadores de membrana se colocaron en un tubo Falcon 1×10^6 células en $100 \mu\text{L}$ de amortiguador de fosfatos y se adicionaron $20 \mu\text{L}$ del anticuerpo específico marcado con diferentes fluorocromos a saber isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína peridin clorofil A (PerCP) o alofocianina (APC). Se mezcló e incubó durante 20 minutos a 4°C , transcurrido el tiempo se adicionó 1 mL de solución de lisis (BD 1: 10) y se mezcló e incubó durante 10 minutos a 4°C en la oscuridad y para la determinación de las células T reguladora FoxP3 que son intracelulares se colocan $100 \mu\text{L}$ de solución permeabilizadora y se deja incubar 10 minutos, transcurrido este tiempo se coloca $10 \mu\text{L}$ del marcador de Fox P3 y se incuba por 20 min a 4°C en la oscuridad. Al final de la incubación, las células se centrifugaron a $300 \times g$ (equivalente a 1500 r.p.m) durante 5 minutos, se decantó y se realizó un lavado adicionando 2 mL de amortiguador de fosfato, se resuspendió, se volvió a centrifugar a $300 \times g$ durante otros 5 minutos, después se eliminó el sobrenadante, se adicionaron 0.8 mL de amortiguador de fosfatos más 0.2 mL de paraformaldehído al 1% en solución salina isotónica para fijar las células. Se mezcló en vórtex a baja velocidad y finalmente, con el tubo en esas condiciones, se adquirieron los datos.

b2. Adquisición de datos.

Se adquirieron 50,000 eventos en el programa de "Cell Quest Pro" versión 3.2.1 "Apple System" 7.6.1, y se seleccionó una región, esto se hizo con el tubo marcado como control de isotipo (autofluorescencia).

Se adquirió toda la población celular y para el análisis se seleccionó la región mononuclear ajustando primero la autofluorescencia de las células, colocando los marcadores de los cuadrantes en una gráfica de puntos “dot plot” en la escala logarítmica entre 10^0 y 10^1 , tanto para el eje de las abscisas (FL1 isotiocianato de fluoresceína) como para el eje de las ordenadas (FL2 ficoeritrina), colocando dicha autofluorescencia en el cuadrante inferior izquierdo en un porcentaje mínimo de 99.4%. Una vez fijados los marcadores de autofluorescencia, se procedió a adquirir las suspensiones celulares de los demás con las tinciones de membrana (FTIC, PE, PercP, APC), respetándose tanto la región como la localización de los cuadrantes. Los resultados para los diferentes marcadores de células se expresan en porcentaje.

Análisis estadístico.

- Es un estudio prospectivo observacional en donde se determinaron las medias, las desviación estándar y el intervalo de confianza de los valores obtenidos de las diferentes subpoblaciones de linfocitos entre el grupo de pacientes con PTI *de novo*. y el grupo control de donadores sanos.
- Para la comparación de donador sano y PTI n se realizó la prueba de U Mann Whitney, para PTIn y PTI Tx se utilizó T pareada, para DS, PTI n y PTI Tx se utilizó Anova con corrección de Bon – Ferroni.

III. Resultados

Se estudiaron 15 pacientes con diagnóstico de PTI *de novo* cuya media de edad fue de 43 años, con un intervalo de 35 – 51 años. Diez de los pacientes (66.6%) fueron mujeres y 5 (33.3%) hombres. Se utilizaron como testigos 20 donadores sanos del banco de sangre cuya media de edad fue de 34 años, Quince (75%) fueron mujeres y 5 (25%) hombres. La distribución de los pacientes y controles se muestra en la figura No 7.

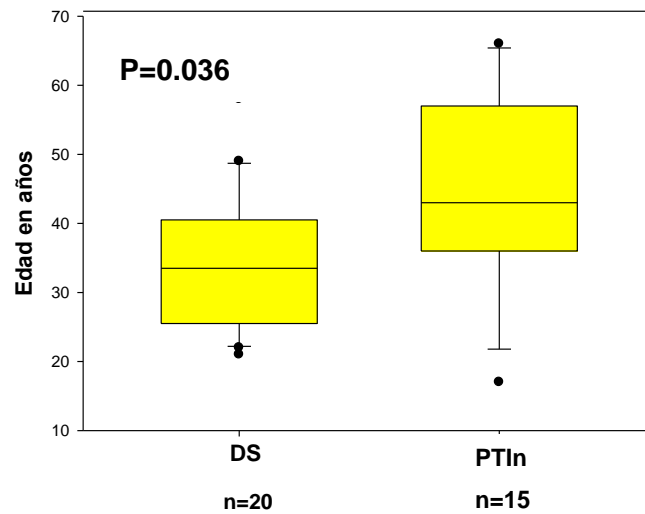
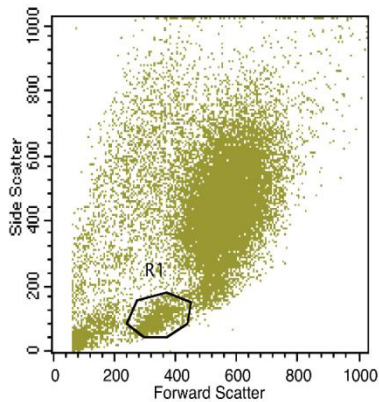
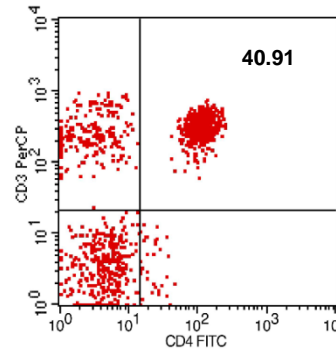


Fig.5. Comparación de las medianas de edad para donador sano (DS) y paciente con PTI *de novo* (PTIn).

A todos los individuos del estudio se les tomaron muestras de sangre periférica para realizar el análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo. En la **figura No.6**, se muestran imágenes representativas de cómo se seleccionó la región R1 para las células linfoides, a partir de la cual se estudiaron las diferentes subpoblaciones linfocitarias.



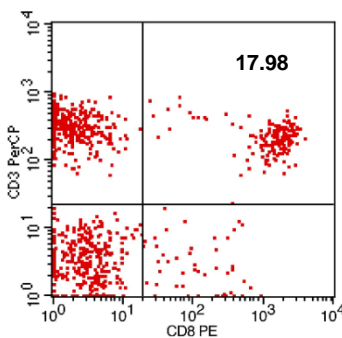
Selección de la región Linfoide (A)



Total Events: 20000
X Parameter: CD4 FITC (Log)
Y Parameter: CD3 PerCP (Log)

Quad	Events	% Gated
UL	222	21.94
UR	414	40.91
LL	348	34.39
LR	28	2.77

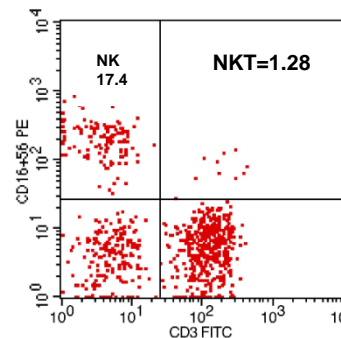
Determinación CD4 (B)



Total Events: 20000
X Parameter: CD8 PE (Log)
Y Parameter: CD3 PerCP (Log)

Quad	Events	% Gated
UL	454	44.86
UR	182	17.98
LL	328	32.41
LR	48	4.74

Determinación de CD8 (C)



Total Events: 20000
X Parameter: CD3 FITC (Log)
Y Parameter: CD16+56 PE (Log)

Quad	Events	% Gated
UL	137	17.47
UR	10	1.28
LL	200	25.51
LR	437	55.74

Determinación de NK Y NKT (D)

Figura No.6. Determinación de células CD4, CD8, NK y NKT por citometría de flujo en una muestra de sangre periférica de un paciente con PTI de novo. (A) Gráfico de puntos de tamaño vs granularidad que muestra la región linfoide (R1) (B). Gráfico de puntos correspondiente al análisis de células CD3⁺/CD4⁺ correspondiente a los linfocitos Th (flechas). (C) Muestra a las CD3⁺/CD8⁺ correspondientes a los linfocitos Tc (flechas) y en (D) a las células "natural killer" y las NKT, todas ellas provenientes de la región R1.

Para la determinación de las células NKT invariantes (NKTi) se partió de la ventana de células CD3⁺ (R2 figura 7A) y se abrió una gráfica de puntos de Vβ11-FITC vs Vα24 – PE (figura 7 B) para denotar las células dobles positivas.

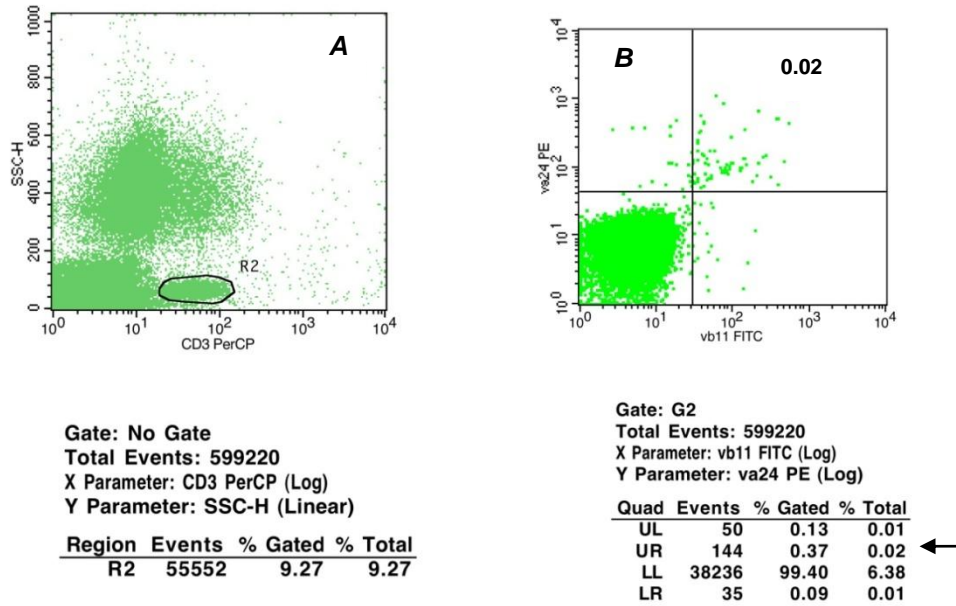


Fig No 7. Determinación de células NKT invariantes por citometría de flujo en una muestra de sangre periférica de un paciente con PTI de novo. En donde se muestra el gráfico de puntos correspondiente al análisis de células NKT invariantes con los marcadores de vβ11 con FITC y vα24 con PE (B), provenientes de la R2 en la que se seleccionó a las células CD3⁺ (A). Las células NKTi (β11⁺ Vα24⁺) se localiza en el cuadrante superior derecho (flecha).

En relación con la caracterización de las células T reguladoras, en la **fig No.8** se muestran imágenes representativas obtenidas de un paciente con PTI *de novo* en donde se seleccionó la R1 CD4⁺ de baja granularidad (A) y a partir de ésta se obtuvo el gráfico de puntos de las células T CD25⁺FoxP3⁺ (B).

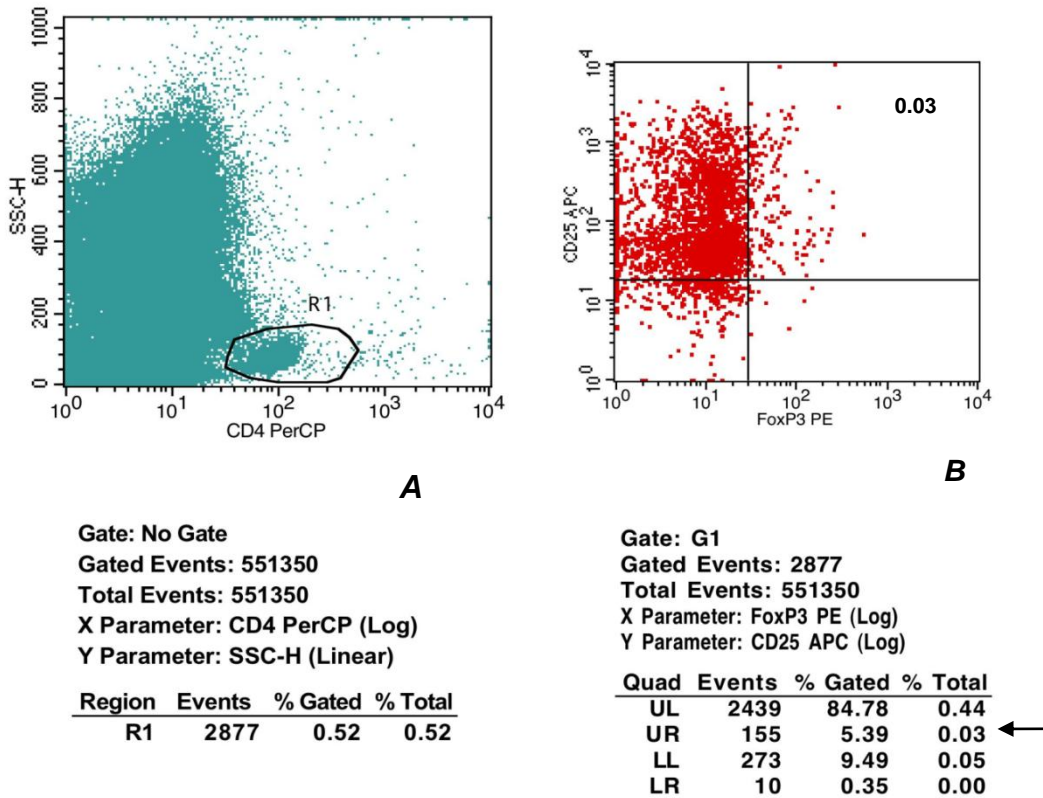
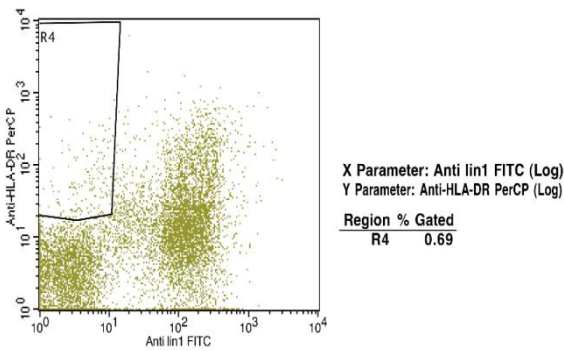
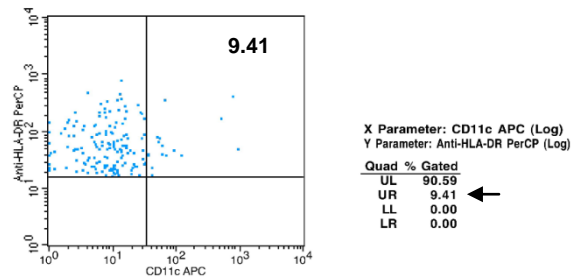


Fig No 8. Determinación de células T reguladoras por citometría de flujo en una muestra de sangre periférica de un paciente con PTI *de novo*. En donde se muestra el gráfico de puntos correspondiente al análisis de las células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, provenientes de la R1CD4⁺ (A) donde se seleccionaron a las células CD4⁺ brillantes), que se localizan en el cuadrante superior derecho (B) flecha.

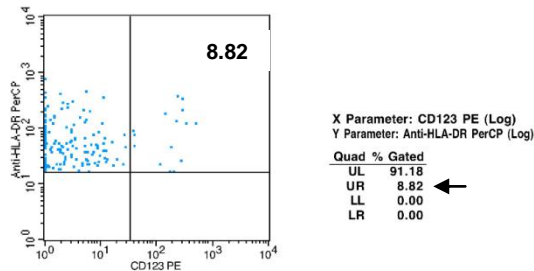
A todos los pacientes se les cuantificaron las células dendríticas tipos 1 y 2 la cual se realiza a partir de la R4 que son Lin 1- HLA-DR+. En la **figura No.9**. Se muestran imágenes representativas de la forma como se realizó dicho análisis



Selección de la región de células Dendríticas R4 (A)



Determinación de Dendrítica tipo 1 a partir de R4 (B)



Determinación de Dendrítica tipo 2 a partir de R4 (C)

Figura No.9. Determinación de células dendríticas tipos 1 y 2 por citometría de flujo en una muestra de sangre periférica de un paciente con PTI de novo. Se muestra el gráfico de puntos correspondiente al análisis de células dendríticas provenientes de la región R4 en la que se seleccionaron las células HLA-DR +, lin - 1 negativas (A). Las células dendríticas tipo 1 son dobles positivas para HLA-DR⁺ y CD11⁺, que se localizan en el cuadrante superior derecho (B) flecha. A partir de la misma ventana R4 se determinaron las células dendríticas tipo 2, siendo dobles positivas para HLA-DR⁺ y CD123⁺, situándose en el cuadrante superior derecho (C) flecha.

Dado que los resultados obtenidos por citometría de flujo se expresan en porcentaje, es conveniente convertirlos a valores absolutos y a partir de estos obtener la mediana, el percentil 25% y 75%. Los resultados así obtenidos se muestran en la tabla No 4. La prueba de análisis fue U Mann Whitney para comparar los valores absolutos de las diferentes

poblaciones analizadas entre pacientes basal y donadores sanos, cuyos resultados también se muestran en la misma tabla, obteniendo diferencia significativa para las cantidades de plaquetas, células NK, NKTi ($V\beta 11V\alpha 24$), linfocitos $T\gamma\delta$, Treg, DC1, DC2 y células CD19.

Tabla No.4. Valores de la Mediana y el percentil 25% y 75% obtenido para las diferentes poblaciones linfoides analizadas de pacientes y donadores.

	Mediana	Percentil 25% - 75%	P
CNT/μL DS	7072.5	6413.9 – 7731.0	NS
PTIn	7761.5	5790.8 – 9732.2	
LfT/μL DS	2454.6	2170.3 – 2738.8	NS
PTIn	2609.0	1764.4 – 3453.5	
PQS/μL DS	268.4	228.9 – 307.9	P=0.000000000002
PTIn	28.5	19.0 – 38.0	
CD3/μL DS	1531.6	1284.6 – 1778.6	NS
PTIn	1522.7	827.0 – 2218.3	
CD4/μL DS	865.4	697.6 – 1033.2	NS
PTIn	692.4	379.3 – 1005.4	
CD8/μL DS	541.4	431.0 – 651.7	NS
PTIn	772.4	358.0 – 1186.9	
NK/μL DS	304.4	232.2 – 376.5	P=0.003
PTIn	158.6	107.2 – 210.0	
NKT/μL DS	169.2	92.9 – 245.4	P=0.03
PTIn	336.9	245.4 – 482.7	
$3\gamma\delta$/μL DS	78.6	56.7 – 100.4	P=0.018
PTIn	127.3	88.8 - 165.7	
NKTI/μL DS	3.1	2.1 – 4.0	P=0.000002
PTIn	14.4	9.6 – 19.1	
T reg/μL DS	9.9	8.2 – 11.7	P=0.02
PTIn	38.5	9.2 – 67.7	
DC1/μL DS	23.5	15.9 – 31.2	P=0.04
PTIn	14.3	11.2 – 17.4	
DC2/μL DS	6.9	5.0 – 8.5	P=0.00002
PTIn	1.7	0.9 – 2.6	
CD19/μL DS	272.7	203.0 – 342.4	P=0.01
PTIn	157.2	101.8 – 212.7	

Nota: **DS**= Donador Sano y **PTIn** = purpura trombocitopénica inmune *de novo*. NS= no significativo.

A continuación se presentan los gráficos obtenidos de la comparación por cada tipo celular de donadores sanos y paciente con PTI *de novo*. En la **figura No.10**, se representa la comparación entre las células **NK/ μL** de donadores sanos vs PTI *de novo*, donde se obtuvo una mediana de 304.4 cels/ μL para donadores sanos y de 158 cels/ μL para pacientes con PTI *de novo* con una diferencia significativa ($P < 0.05$).

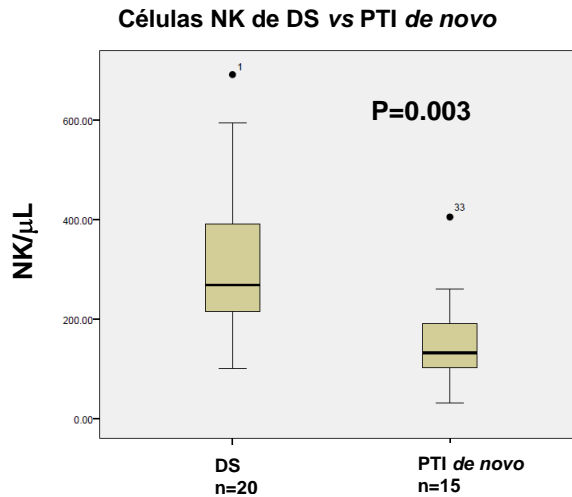


Fig.No.10. Comparación de las medianas para NK entre donadores sanos vs PTI *de novo*

En la **fig No.11**, se muestra la comparación de las células **NKT/ μL** entre donadores sanos vs PTI *de novo*, donde se obtuvo una mediana de 169.2 cels/ μL para donadores sanos y de 336.9 cels/ μL para pacientes con PTI *de novo* es decir, una cantidad más elevada de células NKT en los pacientes con una $P < 0.05$

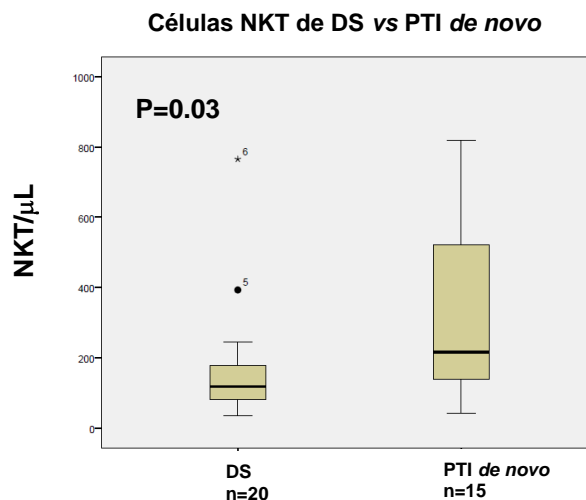


Fig.No.11. Comparación de las medianas para NKT entre donadores sanos vs PTI *de novo*.

En la **fig No.12**, se muestra la comparación entre las células **CD3 $\gamma\delta$** de donadores sanos vs PTI *de novo*, donde se obtuvo una mediana de 78.6 cels/ μ L para donadores sanos y de 127.3 cels/ μ L para pacientes con PTI *de novo*, una cantidad significativamente mayor en pacientes ($P < 0.05$).

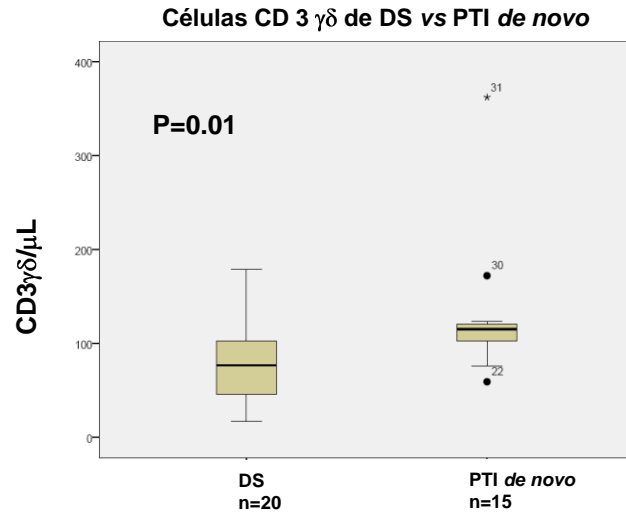


Fig.No 12. Comparación de las medianas para células CD3 $\gamma\delta$ entre donadores sanos vs PTI *de novo*

En la **fig No.13**, se presenta la comparación de las células **NKTI ($V\alpha 24 V\beta 11$)** de donadores sanos vs PTI *de novo*, donde se obtuvo una mediana de 3.1 cels/ μ L para donadores sanos y de 14.4 cels/ μ L para pacientes con PTI *de novo* con un incremento significativo en pacientes ($P < 0.05$).

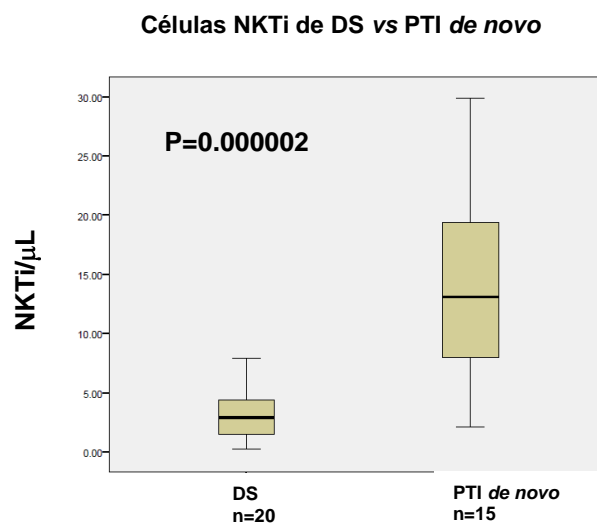


Fig.No.13. Comparación de las medianas para células NKTI entre donadores sanos vs PTI *de novo*.

En la **fig No.14**, se muestra la comparación entre las células **T reguladoras/ μL** de donadores sanos vs PTI *de novo*, en donde se obtuvo una mediana de 9.9 cels/ μL para donadores sanos y de 38.5 cels/ μL para pacientes con PTI *de novo* y un incremento significativo en los pacientes ($P < 0.05$).

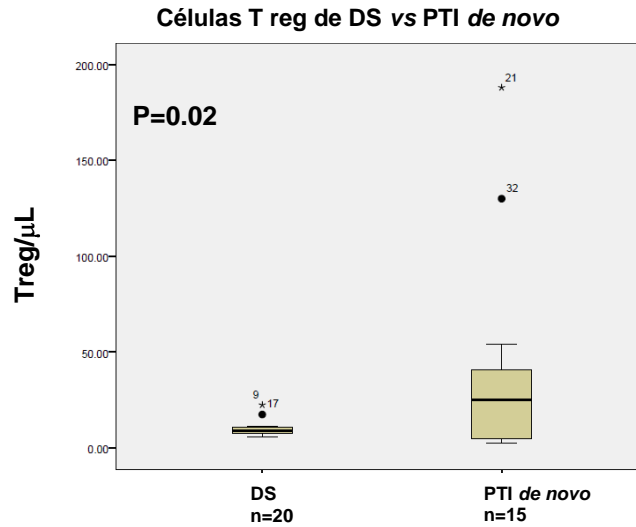


Fig.No.14. Comparación de las medianas para células T reguladoras entre donadores sanos vs PTI *de novo*.

En la **fig No.15**, se muestra la comparación para las células **Dendríticas tipo 1 / μL** entre donadores sanos vs PTI *de novo*, donde se obtuvo una mediana de 23.5 cels/ μL para donadores sanos y de 14.3 cels/ μL para pacientes con PTI *de novo* con disminución de estas células en los paciente ($P < 0.05$).

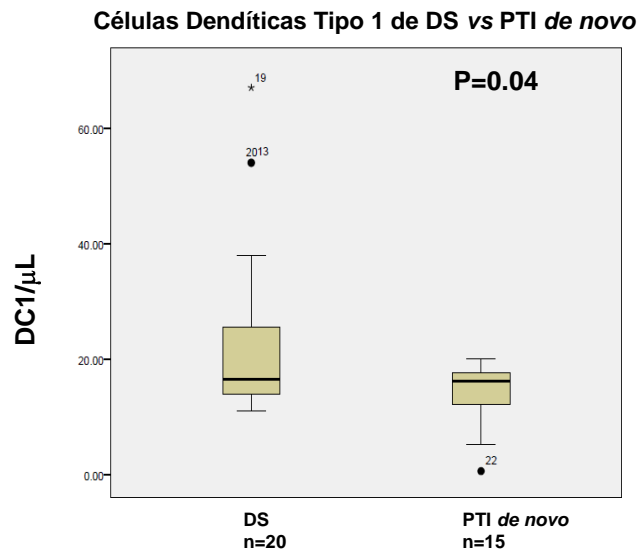


Fig.No.15. Comparación de las medianas para células Dendríticas Tipo 1 entre Donadores sanos vs PTI *de novo*

En la **fig No.16**.se muestra la comparación para las células **Dendríticas tipo 2/ μL** de donadores sanos vs PTI *de novo*, donde se obtuvo una mediana de 6.9 cels/ μL para donadores sanos y de 1.7 cels/ μL para pacientes con PTI *de novo* con una disminución significativa de estas células con los pacientes ($P < 0.05$).

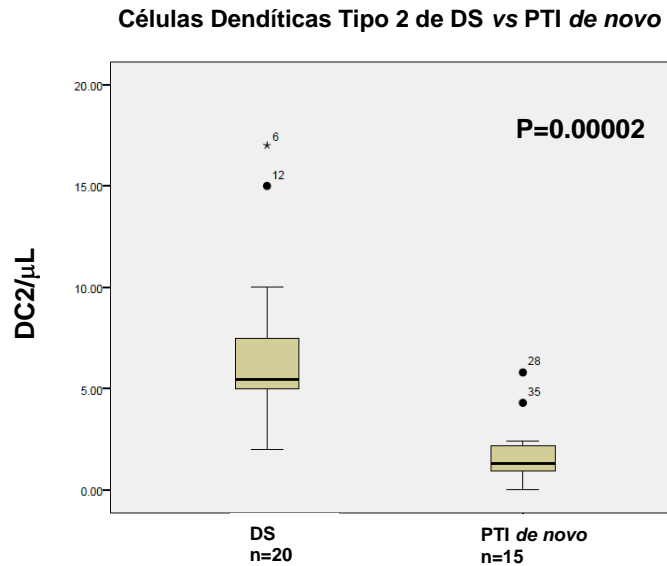


Fig.No.16. Comparación de las medianas para Células Dendrítica Tipo 2 entre donadores sanos vs PTI *de novo*.

En la **fig No.17**. Se muestra la comparación para las células **CD19/ μL** de donadores sanos vs PTI *de novo*, donde se obtuvo una mediana de 272.7 cels/ μL para donadores sanos y de 157.2 cels/ μL para pacientes con PTI *de novo* con una disminución significativa para los pacientes ($P < 0.05$)

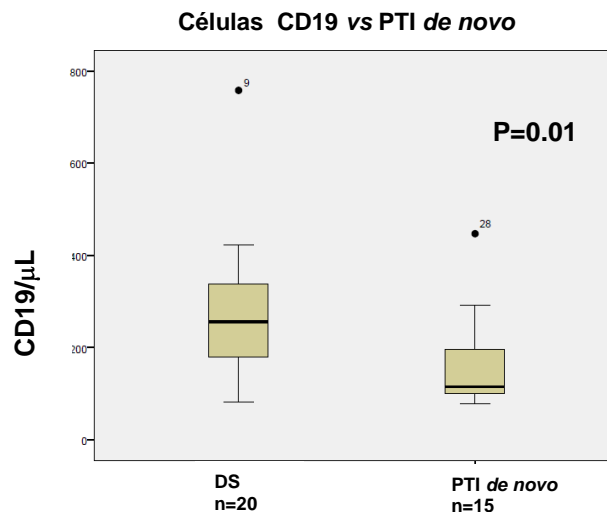


Fig.No.17. Comparación de las medianas para CD19 entre donadores sanos vs PTI *de novo*

Adicionalmente se realizó la cuantificación de las mismas poblaciones de linfocitos totales, células CD3, CD4, CD8, NK, NKT, NKTi, $3\gamma\delta$, T reg, DC1, DC2, CD19 a los tres meses posteriores al tratamiento, por lo que en la tabla No 5, se presentan los resultados obtenidos de la comparación de las diferentes poblaciones analizadas, utilizando la prueba de Anova con corrección de Bon - Ferroni. En dicha tabla se presentan los resultados obtenidos solamente para las poblaciones celulares con diferencia significativa, entre donador sano (DS), contra PTI *de novo* (PTI n) y PTI pos tratamiento (PTI Tx).

Tabla.No.5. Resultados de la comparación de medianas de los diferentes marcadores estudiados por el análisis de Bon – Ferroni.

Marcador	Población de estudio	Mediana (céls/μL)	P
NKT	DS	169.2	DS vs PTIn P=0.04
	PTIn	336.9	DS vs PTI Tx P=0.642
	PTI Tx	77	PTIn vs PTI Tx P=0.005
CD3$\gamma\delta$	DS	78.6	DS vs PTIn P=0.03
	PTIn	127.3	DS vs PTI Tx P=0.206
	PTI Tx	59.3	PTIn vs PTI Tx P=0.001
NKTI	DS	3.1	DS vs PTIn P=0.000001
	PTIn	14.4	DS vs PTI Tx P=1.0
	PTI Tx	3.8	PTIn vs PTI Tx P=0.0000003
T reg	DS	9.9	DS vs PTIn P=0.03
	PTIn	38.5	DS vs PTI Tx P=1.0
	PTI Tx	10.3	PTIn vs PTI Tx P=0.039
DC2	DS	6.9	DS vs PTIn P=0.002
	PTIn	1.7	DS vs PTI Tx P=1.0
	PTI Tx	7.9	PTIn vs PTI Tx P=0.004
CD19	DS	272.7	DS vs PTIn P=0.054
	PTIn	157.2	DS vs PTI Tx P=0.700
	PTI Tx	337.0	PTIn vs PTI Tx P=0.008

Nota: Donador (DS), Purpura Trombocitopénica Inmune *de novo* (PTIn), Purpura Trombocitopénica Inmune con tratamiento (PTITx).

A continuación se presentan las gráficas obtenidas de la comparación por cada tipo celular entre donador sano paciente *de novo* y posterior a tratamiento.

En la **fig No.18** se presenta la comparación de las células **NKT/ μL** entre donadores sanos vs PTI *de novo* vs PTI Tx, obteniendo una mediana de 169.2 cels/ μL para donadores sanos de 336.9 cels/ μL para pacientes con PTI *de novo* y para el paciente tratado 77.0 cels/ μL obteniendo diferencia significativa entre paciente *de novo* respecto al tratado ($P < 0.05$).

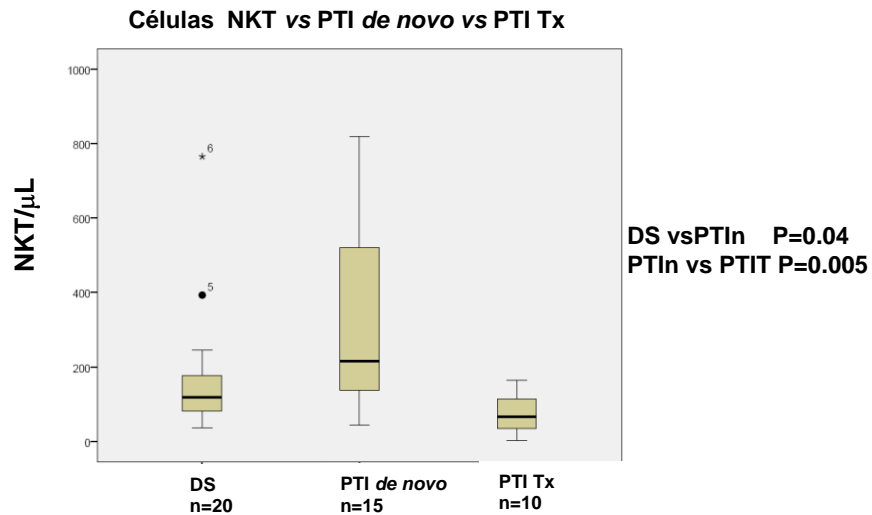


Fig.No 18. Comparación de las medianas para las células NKT entre donadores sanos vs PTI *de novo* vs PTI Tx

En la **fig No.19**, se muestra la comparación para las células **CD3 $\gamma\delta$** de donadores sanos vs PTI *de novo* vs PTI Tx, obteniendo una mediana de 78.6 cels/ μL para donadores sanos y de 127.3 cels/ μL para pacientes con PTI *de novo* y para el paciente tratado 59.3 cels/ μL están disminuidas obteniendo una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre paciente *de novo* respecto al tratado

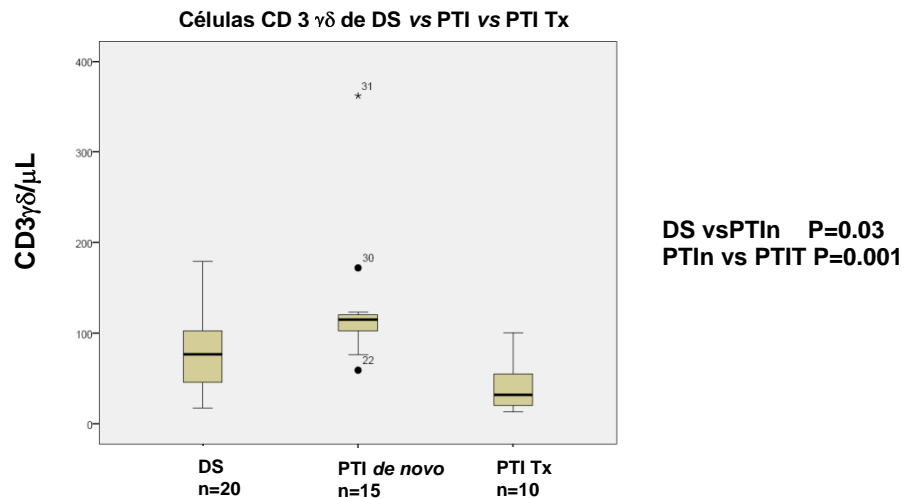


Fig.No 19. Comparación de las medianas para CD3 $\gamma\delta$ entre donadores sanos vs PTI *de novo* vs PTI TX.

En la **fig No.20**.se presenta la comparación para las células **NKTI** / μL entre donadores sanos vs PTI *de novo* vs PTI Tx una mediana de 3.1 cels/ μL para donadores sanos y de 14.4 cels/ μL para pacientes con PTI *de novo* y para paciente tratado 3.8 cels/ μL con un aumento significativa entre paciente *de novo* con respecto al tratado ($P < 0.05$)

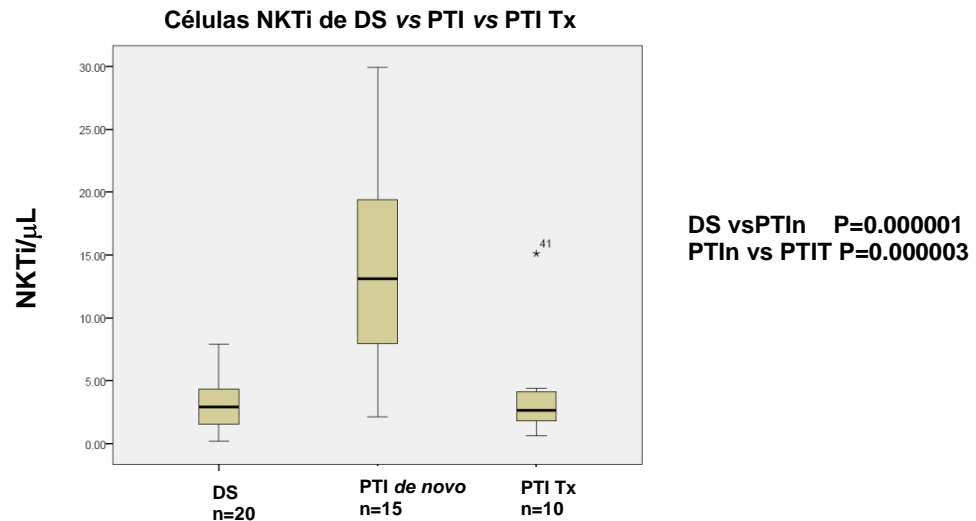


Fig.No 20.Comparación de las medianas para la células NKTI entre donadores sanos vs PTI *de novo* vs PTI TX.

En la **fig No.21** se presenta la comparación de las células **T reg**/ μL entre donadores sanos vs PTI *de novo* vs PTI Tx obteniendo una mediana de 9.9 cels/ μL para donadores sanos y de 38.5 cels/ μL para pacientes con PTI *de novo* y para el paciente tratado 10.3 cels/ μL con una diferencia sinificativa ($P < 0.05$) entre paciente *de novo* y tratado.

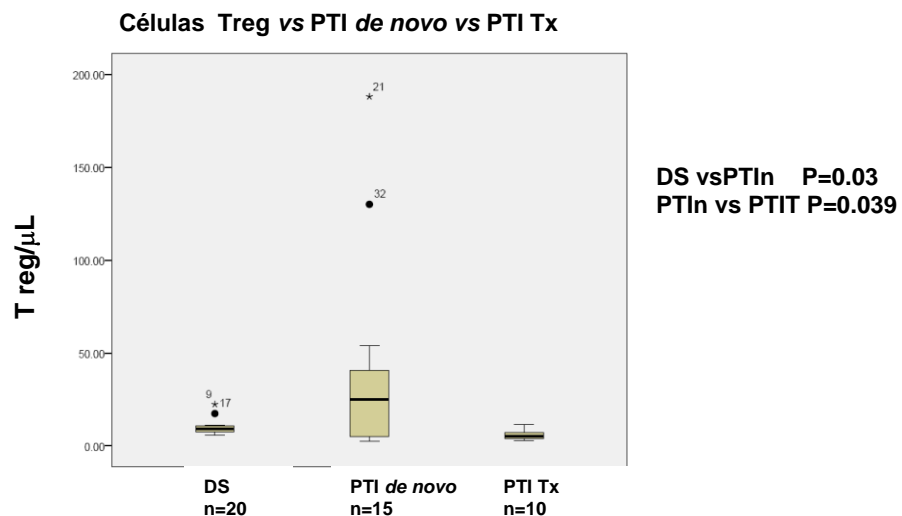


Fig.No 21. Comparación de las medianas para las células Treg entre donadores sanos vs PTI *de novo* vs PTI Tx.

En la **fig No.22** se muestra la comparación células **Dendríticas Tipo 2**/ μL entre donadores sanos vs PTI *de novo* vs PTI Tx,obteniendo una mediana de 6.9 cels/ μL para donadores sanos y de 1.7 cels/ μL para pacientes con PTI *de novo* ,y para el paciente tratado 7.9 cels/ μL con ($P < 0.05$)entre paciente *de novo* y tratado.

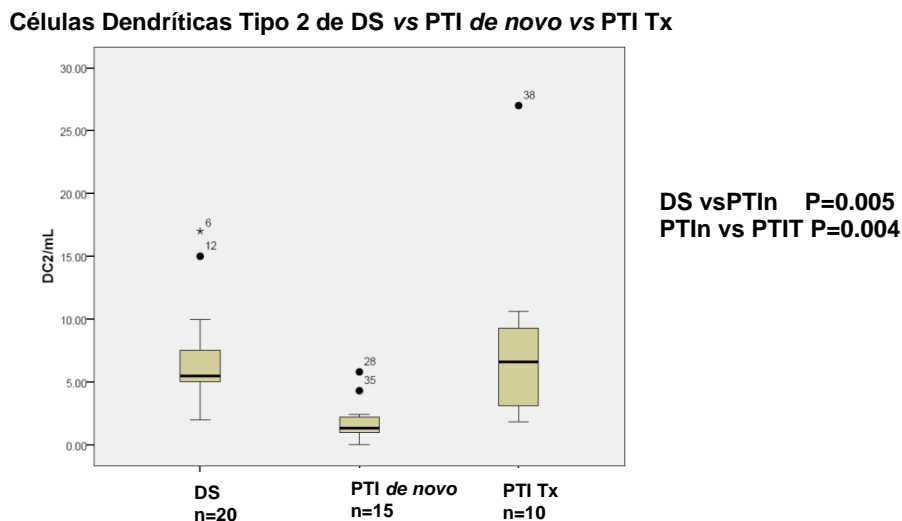


Fig. No 22. Comparación entre las medianas para Células Dendríticas Tipo 2 de Donadores sanos vs PTI *de novo* vs PTI Tx.

En la **fig No.23**. Se muestra la comparación de las células **CD19**/ μL entre donadores sanos vs PTI *de novo* vs PTI Tx, obteniendo una mediana de 272 cels/ μL para donadores sanos y de 157.2 cels/ μL para pacientes con PTI *de novo*,y para el paciente tratado 337.0 cels/ μL con una disminución significativa de estas células en paciente *de novo* ($P < 0.05$).

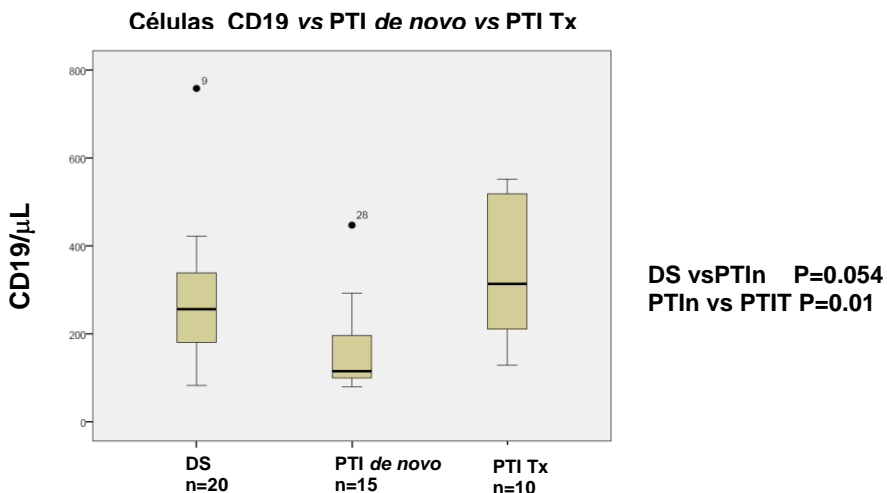


Fig.No 23. Comparación de las medianas para las células CD19 entre donadores sanos vs PTI *de novo* vs PTITX

IV. DISCUSIÓN

La Púrpura trombocitopénica autoinmune (PTI) es una enfermedad en la cual el diagnóstico se sigue realizando por exclusión de otras patologías. Esta se caracteriza por la producción de anticuerpos habitualmente de la clase IgG, contra las glicoproteínas IIb/IIIa de la superficie de las plaquetas, provocando su eliminación prematura y selectiva por las células del sistema fagocítico (SF), siendo el bazo el principal sitio de eliminación. Hasta donde sabemos no se han realizado trabajos a nivel nacional e internacional acerca de la determinación de las poblaciones linfocitarias T: CD3, CD4, CD8, células NK, NKT, CD3 $\gamma\delta$, NKTi, células dendríticas tipo 1 y 2, células T reguladoras FoxP₃⁺ y células B CD19⁺, en pacientes con diagnóstico de PTI *de novo* y post-tratamiento con prednisona. En el presente trabajo se estudiaron dichas subpoblaciones en 10 mujeres y 5 hombres con diagnóstico con PTI *de novo* sin tratamiento, y en 20 donadores clínicamente sanos, de los cuales 15 fueron mujeres y 5 hombres. Es decir, se incluyó mayor cantidad de donadores femeninos que masculinos tratando de guardar la proporción entre ambos grupos de estudio. Por otro lado dicha enfermedad es más frecuente en mujeres que en hombres (Henrik-F1999) lo cual es congruente con la proporción obtenida en este trabajo. Debido a que este padecimiento es de etiología autoinmune, es importante conocer más acerca de la fisiopatología de dicha enfermedad en donde se encuentra involucrada la respuesta autoinmune, motivo por el cual se cuantificaron las poblaciones linfoides T y B en pacientes sin tratamiento y posterior a él. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron diferencias significativas cuando se compararon la cuenta plaquetaria de los donadores sanos (DS) vs PTI *de novo* (PTIn) (P<0.05), lo que se debe a la fisiopatología de la enfermedad donde las plaquetas están siendo destruidas. Respecto a las subpoblaciones linfocitarias CD3, CD4, CD8 para ambos grupos no se encontró diferencia (P>0.05). Al comparar los mismos grupos de estudio para la cantidad de **células NK** estas se encontraron significativamente disminuida (P<0.05) en los pacientes, lo que indica que por su cantidad son insuficientes para realizar adecuadamente su función ya que estas ejercen un efecto contra las células alteradas (opsonizadas) mediante la liberación de enzimas proteolíticas (granzima A, B y granulinas) las cuales pueden penetrar a la célula utilizando perforinas. La granzima B es liberada hacia el citoplasma de la célula blanco y puede activar directamente a las caspasas 8 y 3 induciendo

apoptosis (Lieberman J. 2003), mientras que la granzima A ocasiona la muerte celular de manera independiente de caspasas por rompimiento del DNA (Barry M, 2002). Respecto a las **células NKT** se encontró un incremento significativo de estas células en los pacientes ($P < 0.05$), probablemente debido a que dichas células están involucradas en el control de varios tipos de respuesta inmune, lo que permite suponer que dicho incremento sea debido a un intento por mantener la homeostasis en los pacientes con PTI. Una variedad de estas células son las **células NKT invariantes** que están formadas por un TCR inv $V\alpha 24$ y cadena $V\beta 11$ en humanos, las cuales reconocen glicolípidos presentados por CD1d y no responden a los péptidos (Terabe 2008); estas células están significativamente incrementadas ($P < 0.05$) al comparar DS vs PTIn, esto posiblemente se debe a que estas células tienen la capacidad de regular las alteraciones autoinmunes como es el caso de esta patología. Por lo que se incrementan tratando de controlar el proceso, se considera que son un puente entre la inmunidad innata y adaptativa ya que protegen mediante la producción de $INF\gamma$ el cual a su vez, activa a las células CD8 y a las células dendríticas para que produzca IL-12 (Terabe 2008). La importancia de estas células radica en su potente acción immunoreguladora debida a la liberación rápida y masiva de citocinas tipo Th1 y Th2, especialmente el $INF\gamma$ e IL-4 o IL-10, ejerciendo así su papel regulador. Aún no está claro qué tipo de estímulo se requiere para que se diferencien al tipo regulador o efector. En relación con las **células CD3 $\gamma\delta$** se obtuvo un aumento significativo ($P < 0.05$) en los pacientes. Sin embargo la función de este tipo celular no se conoce, aunque se cree que juegan un papel importante en las enfermedades autoinmunes (Call M 2005., Rangachari 2004). Respecto a las células **T reg** también se obtuvo un incremento significativo ($P < 0.05$) en los pacientes respecto al control, estas células son T CD4+CD25+, conforman el 5% de la población total de células TCD4+. Para funcionar adecuadamente, el sistema inmune debe discriminar entre lo propio y lo no propio, cuando esta capacidad se pierde este sistema comienza a destruir células y tejidos del cuerpo que como resultado, producen las enfermedades autoinmunes. Los Linfocitos T reguladores suprimen efectivamente la activación del sistema inmune protegiendo así contra la autoreactividad. El papel crítico que cumplen los Linfocitos T reguladores en el sistema inmune se ve evidenciado por el grave síndrome autoinmune que resulta cuando hay una deficiencia genética en las

células T reguladoras. El mecanismo molecular por el cual los Linfocitos T reguladores cumplen su función reguladora/supresora no ha sido bien caracterizado. Las citocinas inmunosupresoras como TGF-beta e Interleucina 10 (IL-10) también están implicadas en la función del Linfocito T regulador (Sakaguchi S 1995). Lo que significa que son importantes controladores de la tolerancia inmunológica. Las **células DC2** se encontraron significativamente disminuidas en los pacientes respecto al control ($P < 0.05$), estas células liberan citocinas Th1 y Th2, esto debido a que cumplen una función reguladora y /o tolerogénica que estimula a los linfocitos T, dicha regulación se puede presentar por medio de la IL-10 o por la eliminación de las células T por apoptosis via Fas / Fas L (Steinman 1999). Se ha sugerido que las células T al ser estimuladas por las DC2 entran en un estado de anergia o mueren en respuesta a un estímulo constante y alto de antígeno; estas células son dendríticas de origen plasmocitoide, su progenie tiene el potencial de dar origen a los linfocitos T y a células NK, estos progenitores se encuentran distribuidos en el timo. Son las principales productoras de Interferones de tipo 1 ($IFN \alpha/\beta$) de ahí el nombre de célula productora natural de IFN alfa con aproximadamente 1-2 IU/células (Banchereau J2000., Pulendran B 2001). La DC2 su función es supresora y como se muestra en la tabla No 4 y fig No 18 en los pacientes están muy disminuidas lo que implica que por consiguiente, no están realizando su función. Por último al realizar la comparación para las células **CD 19** se obtuvo una disminución significativa en los pacientes $P < 0.05$, esto se debe en parte a que son células presentadoras de antígeno, productora de anticuerpos, secretora de citocinas proinflamatorias y de coestimulación de la célula T (Zhang 2001). La célula B se ha constituido en una diana terapéutica importante en la Artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunitarias, las células B inducen lisis por citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células, fijación de complemento y apoptosis (Silverman G 2005). En la determinación de las mismas subpoblaciones linfoides a los tres meses después de que estos pacientes recibieron tratamiento con prednisona, (Tabla No.5) el cual actúa suprimiendo la respuesta humoral, disminuye la inflamación por la supresión de la migración de leucocitos polimorfonucleares y reversión del incremento de la permeabilidad, suprime el sistema inmune reduciendo la actividad y volumen linfático, aumenta la supervivencia de las plaquetas disminuye la producción de anticuerpos antiplaquetas que provocan la destrucción plaquetaria.

Después de tres meses de tratamiento supresor se analizaron las determinaciones de las mismas poblaciones linfoides, obteniendo valores muy semejantes a los donadores sanos y sin diferencia significativa para las **células NK** , **NKT** ,**CD3** $\gamma\delta$, **CD3** $\alpha\beta$, **T reg** , **DC2** y por último para **células CD19** ($P>0.05$), entre donador sano y paciente tratado y obteniendo diferencias significativas para las células **NK** , **NKT** ,**CD3** $\gamma\delta$, **CD3** $\alpha\beta$, **T reg** ya que se encontraron elevadas en pacientes con PTIn ($P<0.05$) y para DC2 y CD19 hubo una disminución en los mismos ($P<0.05$) entre pacientes *de novo* y tratados.

V. CONCLUSIONES

- Los pacientes con PTI *de novo* presentaron una cantidad significativamente disminuida de plaquetas, células NK, células dendríticas tipo1 y 2, células CD19 (linfocitos B).
- Los mismos pacientes presentaron un incremento significativo en linfocitos NKT, NKTi, CD3 $\gamma\delta$ y T reguladoras.
- Con el tratamiento inmunosupresor, los pacientes normalizaron los valores de las diferentes poblaciones celulares analizadas NK, NKT, NKTi, CD3 $\gamma\delta$ y T reguladoras, DC2, CD19.

EXPECTATIVAS PARA TRABAJOS FUTUROS

Con base en los resultados obtenidos es conveniente determinar si estas poblaciones celulares son funcionales o tienen actividad citotóxica.

Por otro lado, se propone identificar si en esta enfermedad participa el proceso de inflamación esto mediante la determinación de las subpoblaciones de linfocitos Th17.

Determinar marcadores de superficie plaquetaria y observar si las plaquetas en los pacientes con PTI *de novo* se encuentran activadas.

Bibliografía.

1. Alvarnas J .C ., Linn Y. C ., Hope E. G., Negrin R: S.,2001 Expansion of cytotoxic CD3+CD56+ cells from peripheral blood progenitor cells of patient undergoing hematopoietic cell transplantation . Biol Blood Marrow Transplant 7: 216 – 222.
2. Aster RH, Keene WR - Sites of platelet destruction in idiopathic thrombocytopenic purpura. Br. J Haematolo 1969; 16: 61 – 73.
3. Bach JF, Infections and autoimmune diseases, J. Autoimmun. 2005; 25 suppl 1: 74 – 80.
4. Banchereau J,Briere F,Caux C,Davoust J ,Lebecque S Lui YJ.Immunobiology of dendritic cells. Rev Immunol 2000;18:767 – 811.
5. Barry M.,Blenackley C,2002 Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death.Nature Rev Immunol 2:401-409
6. British Committee for Standards in Haematology General Haematology Task Force. Guidelines for the investigation and management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and in pregnancy.Br J Haematol 2003; 120:574-596.
7. Brutkiewics R.R., Sriram V. Natural killer T (NKT) cells and their role in antitumor immunity. Crit Rev Oncol Hematol 2002. 41:287-298.
8. Call ME, Wucherpfennig KW. The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. Rev Immunol. 2005, 23: 101-25.
9. Calpin C, Dick P, Foon A, Feldmann W. Is bone marrow aspiration needed in acute childhood idiopathic thrombocytopenic purpura to rule out leukemia? Arch Pediatr Adolesc Med 1998; 152: 345 – 347
10. Chong BH, Ho J. Autoimmune thrombocytopenia. J Thromb Haemost. 2005; 3:1763 – 1772.
11. Chog BH, Keng TB. Advances in the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. Semin Hematol 2000; 37: 249 – 60.
12. Cines DB, Blanchette V. Immune thrombocytopenic purpura. N Engl J Med. 346 2002: 346 (13): 995 – 1008.
13. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. N Engl J Med. 2001; 345: 340 – 350.
14. Douglas B, Cinnes, M.D, Blanchette Victor S. Blanchette M. B, Chir B. Inmune Trombocitophenic Purpura. N Engl J Med. 346 (13) 2002: 995-1009.

15. Fontenot Jason D, Marc A Gavin and Alexander Y .Rudensky. 2003 Fox P3 programs the development and function of CD4+, CD25+ regulator T cells. *Nat immunol*.4:330 – 336.
16. George JN, Raskob GE. Idiopathic thrombocytopenia purpura: A concise summary of the pathophysiology and diagnosis in children and adults. *Semin Hematol* 1998; 36: 5-8.
17. Good now CC, Sprent J, de st Groth. BF, Vinuesa.CG; Cellular and genetic. Mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 2005; 435:590 – 597.
18. Henrik-Frederiksen H, Schmidt K. 1999. The incidence idiopathic thrombocytopenic purpura in adults increases with age. *Blood: Vol 2* 909-913.
19. Johana E. A. Portielje, Rudi G. J. Westendorp, Hanneke C. Kluin-Nelemans, and Anneke Brand. Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2001; 9: 2549-2554.
20. Jones HW, Tocantis LM, The history of purpura hemorrhagica, *Ann Med Hist* 1933; 5: 349 – 359.
21. Kanelson P Verschwinden der hä morrhagischen diatse bei einem falte von essentieler thrombopenie nach milzeystipation. *Wein klin wocchenschr* 1916; 29: 1451.
22. Karpatkin S. Autoimmune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 1985; 22: 260 – 288.
23. Kellaf M, Michel M, Sheffer A, Bierling P, Godeau B. Assesement of a therapy strategy for adults with severe autoimmune thrombocytopenic purpura based on bleeding score rather than platelet count. *Haematologica*. 2005; 90: 829 – 832.
24. Kuwana M, Kawakami Y, Ikeda Y. Supression of autoreactive T-cell response to glycoprotein IIb/IIIa by blockade of CD40/CD154 interaction: implications for treatment of immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 2003; 101: 621 -623.
25. Lieberman J.2003 The ABC of granule- mediated citotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature Rev Immunol* 3:361-370.
26. MacDonald K.P.,Munster D.J., Clarck G.J.,Dzionic A., Schmitz J., Hart D.Characterization of human blood dendritic cell subsets.*Blood*, 2002. 100: 4512 – 4520.
27. Marrack P, Kappler J, Rotzin BL. Autoimmune disease: why and were it occurs. *Nat. Med*. 2001; 7: 899 – 905.

28. Martínez – Murillo C, Quintana González S, Garcia Lee T Collazo Jaloma J. Guzmán I, Gamino Gómez E. Púrpura Trombocitopénica Autoinmune, Actualización en diagnóstico y tratamiento Rev. Hemostasia y trombosis 2007: pp 6-12
29. Mead A, Neuland AC, Provan D. Adult idiopathic Thrombocytopenic Purpura. Hematology 2003; 8 (6): 345-357.
30. Mondino A, Rhoruts A, Jenkins ML. The anatomy of T-cell activation and tolerance. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1996; 93: 2245 – 2252.
31. Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. Nature rev immunol 2002, 2: 957 -964.
32. Pujol-Moix, Muñoz E, Besses C. Trombocitopenias y trombocitopatías. Hematología Clínica, 5ª. Ed. Madrid Esp. 2002; Editorial Elsevier. Cap 34, pp, 694 - 695
33. Pizzuto J, Ambriz R. Therapeutic experience on 934 adults with idiopathic thrombocytopenic purpura: Multicentric Trial of the Cooperative Latin American group on Hemostasis and Thrombosis. Blood. 1984, 64: 1179 – 1183.
34. Rangachari M, Penninger JM. Negative regulation of T cell receptor signals. Curr Opin Pharmacol. 2004, 4: 415-22.
35. Regueiro González. J.R. López Larrea C. González rodríguez S. Martínez Naves E. Inmunología, Biología y Patología del Sistema Inmune. 3ª. Ed. Ed. Panamericana , Méx. 2006; P 133
36. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol. 1995; 155:1151-64.
37. Sakaguchi Shimon. 2003. The origin of FoxP3-expressing, CD4+ regulator T cells: thymus or periphery. J Clin Invest. 112:1310-1312.
38. Silverman GJ. Anti-CD20 therapy in systemic lupus erythematosus: a step closer to the clinic. Arthritis Rheum. 2005; 52:371-7.
39. Stasi R. Provan D. Management of immune thrombocytopenic purpura in adults. Mayo Clin Proc. 2004; 79: 504 – 522.
37. Steinman RM Inaba K. Myeloid dendritic cells. J Leukoc Biol 1999;66:205 -208.
- Tarantino M. Acute Immune (idiopathic) thrombocytopenic purpura in childhood. Blood.

Rev. 2002; 16: 19 -21

38. Terabe M., Bersofsky J., The role of NKT cells in tumor immunity, cancer Res. 2008; 101:277-348.

39. Valverde F, Gil C, Ramos T. Púrpura trombocitopénica idiopática, Aspectos actuales. An. Esp. Pediatr. 1997 VOL 2 p 50 – 62.

40. Warkentin T. E, Kelton J.G. Current concepts in the treatment of immune 1990; 40: 531 – 542.

41. Wilson S.B., Delovitch T.L. Janus – like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumour immunity. Nature 2003 Rev Immunol 3 : 211 – 222.

42. Zhang Z, Bridges SL Jr. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: role of B lymphocytes. Rheum Dis Clin North Am. 2001; 27:335-5

ANEXO I

México, D.F. a _____ de _____ 2009.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio del presente y en pleno uso de mis facultades, yo

doy mi CONSENTIMIENTO para participar en el protocolo de investigación “Caracterización de las subpoblaciones linfocitarias T en pacientes adultos con Púrpura Trombocitopénica Inmune *de novo*”, el cual está en registro en el Instituto Politécnico Nacional en la secretaria de investigación y posgrado de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, y se realizará en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas en el Departamento de Morfología bajo la dirección de la Dra Elba Reyes Maldonado y en el Laboratorio de Hematología Especial del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “La Raza”, bajo la dirección de la Dra. Laura Arcelia Montiel Cervantes. Con el objetivo de determinar las subpoblaciones linfocitarias T, B y células dendríticas en sangre periférica pacientes con Púrpura Trombocitopénica Inmune *de novo* y compararla con sujetos sanos que asistan al Banco de sangre del Centro Médico Nacional “La Raza”, ya que esta es una enfermedad que se caracteriza por la producción de anticuerpos habitualmente de la clase IgG contra las glicoproteínas IIb/IIIa de la superficie de las plaquetas, provocando eliminación prematura por las células del sistema fagocítico (SF), siendo el bazo el principal lugar de eliminación.

La información que se obtenga de mi participación será manejada de manera confidencial, el estudio no tiene costo alguno para mí o para mis familiares, y no interferirá con mi tratamiento.

Consiste en la toma de muestra de sangre periférica en un tubo heparinizado (3cc), por personal capacitado y cuyos riesgos se me explicaron (moretón, inflamación, dolor en la punción etc.). Además de contestar unas preguntas referentes a mi padecimiento.

Mi participación en el estudio es enteramente voluntaria, se respetara mi decisión, sin que por ello se me niegue el servicio o me condicione.

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma del Medico.

Caracterización de las subpoblaciones linfoides T en pacientes con Púrpura Trombocitopénica Inmune *de novo*.

Fecha _____ No. _____

Nombre del paciente _____

Edad _____ Sexo _____

1. Tiempo transcurrido desde el diagnóstico de PTI de novo hasta el momento de la entrevista. _____

2. Tiempo de evolución _____

3. ¿Se encuentra bajo algún tratamiento para PTI u otro padecimiento? _____

Si _____ NO _____ ¿Cuál? _____

4. ¿Padece alguna complicación de la Púrpura Trombocitopénica Inmune. _____

ANEXO II

México, D.F. a _____ de _____ 2009.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio del presente y en pleno uso de mis facultades, yo

doy mi CONSENTIMIENTO para participar en el protocolo de investigación “Caracterización de las subpoblaciones linfocitarias T en pacientes adultos con Púrpura Trombocitopénica Inmune *de novo*”, el cual está en registro en el Instituto Politécnico Nacional en la secretaria de investigación y posgrado de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, y se realizará en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas en el Departamento de Morfología bajo la dirección de la Dra Elba Reyes Maldonado y en el Laboratorio de Hematología Especial del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “La Raza”, bajo la dirección de la Dra. Laura Arcelia Montiel Cervantes. Con el objetivo de determinar las subpoblaciones linfocitarias T, B y células dendríticas en sangre periférica pacientes con Púrpura Trombocitopénica Inmune *de novo* y compararla con sujetos sanos que asistan al Banco de sangre del Centro Médico Nacional “La Raza”, ya que esta es una enfermedad que se caracteriza por la producción de anticuerpos habitualmente de la clase IgG contra las glicoproteínas IIb/IIIa de la superficie de las plaquetas, provocando eliminación prematura por las células del sistema fagocítico (SF), siendo el bazo el principal lugar de eliminación.

La información que se obtenga de mi participación será manejada de manera confidencial, el estudio no tiene costo alguno para mí o para mis familiares.

Consiste en la toma de muestra de sangre periférica en un tubo heparinizado (3cc), por personal capacitado y cuyos riesgos se me explicaron (moretón, inflamación, dolor en la punción etc.). Además de contestar unas preguntas que contribuirán al estudio.

Mi participación en el estudio es enteramente voluntaria.

Nombre y firma del Donador

Nombre y firma Testigo

Caracterización de las subpoblaciones linfoides T en pacientes con Púrpura Trombocitopénica Inmune *de novo*.

Fecha _____ No. _____

Nombre del Donador _____

Edad _____ Sexo _____

1. confirmar que no padezca alguna enfermedad que afecte los resultados que se obtengan en el estudio.

ANEXO III

1. Para determinar los valores absoluto de los marcadores obtenidos en porciento de las poblaciones linfoides se realizó lo siguiente:

$$\text{Lf Total}/\mu\text{l} = (\text{CN}/\mu\text{l})(\text{I Lf I})$$

$$\text{C de CD} / \mu\text{l} = (\text{Lf Total}/\mu\text{l}) (\text{I CD I})$$

2. Para determinar valores absolutos de células dendrítica se realizó lo siguiente:

$$\text{DC}/\mu\text{l} = (\text{CN}/\mu\text{l}) (\text{I RDC I}) (\text{I DC I})$$