

# Utilidad de la determinación de anticuerpos antiplaquetarios en el diagnóstico de trombocitopenia inmunitaria primaria

Hernández-Blas Al<sup>1,2</sup>, Rodríguez-Morales U<sup>2</sup>, Vallejo-Villalobos MF<sup>1,2</sup>, Zepeda-Camacho L<sup>2</sup>, Cano-Jiménez O<sup>1</sup>, Ruiz-Argüelles GJ<sup>1,4</sup>

## Resumen

**ANTECEDENTES:** la trombocitopenia inmunitaria primaria se caracteriza por trombocitopenia aislada con cuentas plaquetarias menores de  $100 \times 10^9/L$  en ausencia de otras causas o enfermedades que puedan estar asociadas con la trombocitopenia. Los anticuerpos antiplaquetarios constituyen el principal mecanismo en la eliminación acelerada de las plaquetas, debido a que están dirigidos contra proteínas diversas que se encuentran en la superficie de las plaquetas. La demostración de anticuerpos antiplaquetarios es un auxiliar en el diagnóstico de trombocitopenia inmunitaria primaria y puede ser de utilidad en la evaluación de la respuesta al tratamiento con medicamentos inmunosupresores.

**OBJETIVO:** evaluar la utilidad de la determinación de anticuerpos antiplaquetarios en el diagnóstico de trombocitopenia inmunitaria primaria.

**MATERIAL Y MÉTODO:** estudio observacional, transversal, retrospectivo de 10 años, realizado en una sola institución, en el que se analizaron los resultados de investigar los anticuerpos antiplaquetarios mediante el método de citometría de flujo, al utilizar anticuerpos monoclonales contra las glucoproteínas IIb y IIIa de las plaquetas y globulina antihumana polivalente, marcada con isotiocianato de fluoresceína, en un grupo de pacientes con trombocitopenia.

**RESULTADOS:** en el periodo seleccionado se realizaron 2,549 estudios para investigar los anticuerpos antiplaquetarios; de ellos, sólo 75 pruebas fueron positivas (dos en pacientes con trombocitopenia inmunitaria primaria y 73 en pacientes con trombocitopenia por otras causas). En los 2,474 casos en los que las pruebas fueron negativas, hubo 62 casos de trombocitopenia inmunitaria primaria. En un grupo de 64 pacientes con esta enfermedad, sólo en 2 (3%) se reportaron anticuerpos antiplaquetarios. Mediante la prueba exacta de Fisher no se encontró asociación estadísticamente significativa entre la existencia de anticuerpos antiplaquetarios y el diagnóstico de trombocitopenia inmunitaria primaria ( $p=0.712682$ ).

**CONCLUSIONES:** los hallazgos indicaron poca utilidad de la prueba de investigación de anticuerpos antiplaquetarios en el diagnóstico de trombocitopenia inmunitaria primaria, por lo que parece ser inútil seguir realizándola.

**PALABRAS CLAVE:** trombocitopenia inmunitaria primaria, anticuerpos antiplaquetarios.

<sup>1</sup> Laboratorios Clínicos de Puebla, Puebla, México.

<sup>2</sup> Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, Puebla, México.

<sup>3</sup> Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla, Puebla, México.

<sup>4</sup> Universidad de las Américas Puebla, Puebla, México.

Recibido: noviembre 2015

Aceptado: febrero 2016

## Correspondencia

Dr. Guillermo J Ruiz Argüelles  
gruiz1@clinicaruiz.com

## Este artículo debe citarse como

Hernández-Blas Al, Rodríguez-Morales U, Vallejo-Villalobos MF, Zepeda-Camacho L y col. Utilidad de la determinación de anticuerpos antiplaquetarios en el diagnóstico de trombocitopenia inmunitaria primaria. Rev Hematol Mex. 2016 julio;17(3):169-174.

Rev Hematol Mex. 2016 July;17(3):169-174.

## Usefulness of antiplatelet antibodies determination in the diagnosis of primary immune thrombocytopenia.

Hernández-Blas AI<sup>1,2</sup>, Rodríguez-Morales U<sup>2</sup>, Vallejo-Villalobos MF<sup>1,2</sup>, Zepeda-Camacho L<sup>2</sup>, Cano-Jiménez O<sup>1</sup>, Ruiz-Argüelles GJ<sup>1-4</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** Primary immune thrombocytopenia is characterized by isolated thrombocytopenia with platelet counts below  $100 \times 10^9/L$  and the absence of other causes or diseases that may be associated with thrombocytopenia. Antiplatelet antibodies are the main mechanism for the accelerated destruction of platelets, as they are directed against different proteins that are present on the surface of platelets. The demonstration of antiplatelet antibodies is an aid for the diagnosis of primary immune thrombocytopenia and may be useful in assessing the response to treatment with immunosuppressive drugs.

**OBJECTIVE:** To evaluate the usefulness of the determination of antiplatelet antibodies in the diagnosis of primary immune thrombocytopenia.

**MATERIAL AND METHOD:** An observational, cross-sectional and retrospective study of 10-year period and in a single institution; the results of the determination of antiplatelet antibodies were analyzed in a group of patients with thrombocytopenia by the method of flow cytometry using monoclonal antibodies against the IIb and IIIa glycoproteins of platelets and anti-human polyvalent globulin labeled with fluorescein isothiocyanate.

**RESULTS:** 2,549 determinations were performed for the study of antiplatelet antibodies; of these, only 75 tests were positive (2 in patients with primary immune thrombocytopenia and 73 in patients with other causes of thrombocytopenia). 2,474 determinations were negative in which 62 cases of primary immune thrombocytopenia were shown. In a group of 64 patients with primary immune thrombocytopenia, only 2 patients showed positive antiplatelet antibodies (3%). Using the Fisher's exact test, we did not find a significant association between the presence of antiplatelet antibodies and diagnosis of primary immune thrombocytopenia ( $p=0.712682$ ).

**CONCLUSIONS:** Findings indicate a poor association of antiplatelet antibodies and primary immune thrombocytopenia; the test conducted by the described method seems to be useless in the diagnosis of primary immune thrombocytopenia.

**KEYWORDS:** primary immune thrombocytopenia; antiplatelet antibodies

<sup>1</sup> Laboratorios Clínicos de Puebla, Puebla, México.

<sup>2</sup> Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, Puebla, México.

<sup>3</sup> Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla, Puebla, México.

<sup>4</sup> Universidad de las Américas Puebla, Puebla, México.

### Correspondence

Dr. Guillermo J Ruiz Argüelles  
gruiz1@clinicaruiz.com

## ANTECEDENTES

La trombocitopenia inmunitaria primaria es un trastorno autoinmunitario adquirido, que se caracteriza por trombocitopenia aislada, definida como cuenta plaquetaria en la sangre periférica menor a  $100 \times 10^9/L$ , sin tener causa aparente.<sup>1</sup> Se estima que la incidencia anual de la trombocitopenia inmunitaria primaria en adultos es de 2 a 4 casos por cada 100,000 personas.<sup>2</sup>

Datos epidemiológicos recientes sugieren que la incidencia en adultos es prácticamente igual en uno y otro sexo, excepto entre los 30 y 60 años de edad, cuando es más prevalente en mujeres.<sup>3</sup> En México existen pocos datos epidemiológicos acerca de esta enfermedad, lo que afecta a la práctica del hematólogo en los diversos ámbitos de la especialidad.

Con frecuencia, las recomendaciones de las guías extranjeras no pueden aplicarse en México debido a que se carece de recursos y por las diferencias culturales, tanto de médicos como de pacientes, costumbres arraigadas, diferencias en el acceso a la información y en las condiciones de alimentación y vivienda, entre otros. En ocasiones pueden hacerse modificaciones a los esquemas recomendados, que reducen los gastos, pero sin perder la eficacia terapéutica.<sup>4</sup>

## MATERIAL Y MÉTODO

Estudio observacional, transversal, retrospectivo,<sup>5-7</sup> realizado en 10 años y en una sola institución, en el que se analizaron los resultados de investigar los anticuerpos antiplaquetarios mediante el método de citometría de flujo, empleando anticuerpos monoclonales contra glucoproteínas IIb y IIIa de las plaquetas y globulina antihumana polivalente, marcada con isotiocianato de fluoresceína, en un grupo de pacientes con trombocitopenia.

### Metodología de la determinación de anticuerpos antiplaquetarios

Los pacientes con trombocitopenia inmunitaria primaria, sea primaria o secundaria a enfermedades autoinmunitarias multiorgánicas, cursan con destrucción periférica de las plaquetas como resultado de su sensibilización con anticuerpos. En un porcentaje de estos pacientes es posible demostrar la existencia de inmunoglobulinas (principalmente del isótipo IgG) unidas a la membrana plaquetaria; y en otros, además, es posible demostrar la existencia de anticuerpos libres en el suero, que son capaces de unirse a las plaquetas provenientes de donadores sanos. La demostración de unos y otros es un auxiliar en el diagnóstico de púrpura de origen inmuno-lógico y puede ser de utilidad en la evaluación de la respuesta al tratamiento con medicamentos inmunosupresores.

Los aparatos usados en este estudio fueron Gallocios de Beckman-Coulter y un instrumento de lisis y fijación Coulter TQ-Prep.

### Muestreo y muestra

Sangre anticoagulada (heparina) del paciente y de un sujeto sano y suero del paciente. Las muestras deben analizarse en las 72 horas siguientes a su obtención. Una vez teñidas y fijadas, las muestras pueden analizarse en las siguientes 24 horas. Las muestras no podrán ser procesadas en caso de que su fecha de obtención supere las 72 horas y las células viables son escasas y si tienen signos importantes de deterioro, como hemólisis, existencia de coágulos o viscosidad.

### Sistema analítico

Anticuerpos contra las glucoproteínas IIb y IIIa de las plaquetas y globulina antihumana polivalente marcada con isotiocianato de fluoresceína.

### Uso del sistema analítico

Disponer de cuatro tubos de polipropileno, de 12x75 mm, marcados como: a) control positivo, b) control negativo, c) plaquetas autólogas y d) plaquetas alogénicas. Después, colocar 50 µL de sangre control<sup>1</sup> en los tubos a, b y d; colocar 50 µL de sangre del paciente en el tubo c; agregar 20 µL de suero del paciente a los tubos c y d; agregar el anticuerpo monoclonal CD41 acoplado a ficoeritrina a todos los tubos; añadir el anticuerpo monoclonal CD61 acoplado a isotiocianato de fluoresceína al tubo a; agregar 5 µL de globulina antihumana polivalente marcada con isotiocianato de fluoresceína a los tubos b, c y d. Incubar como mínimo 30 minutos a temperatura ambiente; lisar y fijar de manera automática mediante el reactivo TQ-prep; pasar las muestras en el citómetro de flujo, programado para la detección de dispersión frontal y dispersión lateral, log de fluorescencia a 525 nm y log de fluorescencia a 575 nm.

### Procesamiento de datos

Mediante la construcción de un histograma biparamétrico de log FL2 y dispersión lateral hay que definir una ventana electrónica que circunscriba el análisis de fluorescencia a las plaquetas.

Mediante la construcción de un histograma uniparamétrico de log fluorescencia 525 nm, debe cuantificarse el porcentaje de células que tienen en su membrana isotiocianato de fluoresceína. En el tubo a, más de 90% de las células deben ser positivas, pues están teñidas con el anticuerpo monoclonal CD61, que se expresa en todas las plaquetas. Si el porcentaje de células positivas es menor a 90%, debe corregirse la posición de la

<sup>1</sup>Sangre control: muestra con parámetros hematológicos normales.

Nota: la concentración de globulina antihumana polivalente marcada con isotiocianato de fluoresceína varía, según el fabricante.

ventana electrónica de manera óptima, analizar el tubo b, que deberá contener menos de 2% de eventos positivos, y se utilizará como control isotípico para colocar la posición del cursor lineal. En los tubos c y d se cuantificará el porcentaje de plaquetas positivas que reflejan la existencia de anticuerpos autólogos y heterólogos, respectivamente. Se considera que el resultado es positivo cuando existe más de 25% de eventos positivos (por arriba del tubo b).

Mediante la revisión del expediente clínico se obtuvieron 64 pacientes con trombocitopenia inmunitaria primaria, de los que 17 eran hombres, estudiados y tratados por uno de nosotros (GJRA).

El criterio de inclusión fue: pacientes con determinación de anticuerpos antiplaquetarios con diagnóstico establecido de trombocitopenia inmunitaria primaria; los criterios de exclusión fueron: pacientes con determinación de anticuerpos antiplaquetarios sin trombocitopenia, pacientes con determinación de anticuerpos antiplaquetarios con diagnóstico de trombocitopenia no inmunitaria y pacientes con determinación de anticuerpos antiplaquetarios con diagnóstico de trombocitopenia inmunitaria primaria junto con otra enfermedad.

### Análisis estadístico

En el análisis estadístico se utilizó el programa Minitab 17, usando los siguientes datos: determinación de anticuerpos antiplaquetarios: 2,549 en total; de éstos, 75 fueron positivos (sólo dos con trombocitopenia inmunitaria primaria y 62 con otro diagnóstico).

En los 2,474 casos en que las pruebas fueron negativas, hubo 62 casos de trombocitopenia inmunitaria primaria y el resto (2,412) sin esta afección (Cuadro 1).

Las dos variables que se consideraron son categóricas para probar la hipótesis de si existe

**Cuadro 1.** Pruebas de casos con y sin trombocitopenia inmunitaria primaria

	Anticuerpos antiplaquetarios		
	Positivos	Negativos	
Con trombocitopenia inmunitaria primaria	Sí	2	62
	No	73	2,412
Total		75	2,474
			2,549

asociación entre los anticuerpos antiplaquetarios y la trombocitopenia inmunitaria primaria; se usó en primera instancia la prueba de  $\chi^2$  para independencia de variables. Se escogió un nivel de significación ( $\alpha=0.05$ ) [Cuadro 2]. En este caso, como una de las frecuencias esperadas en la prueba de  $\chi^2$  era menor de cinco se usó la prueba exacta de Fisher (Cuadro 3).

Se contrastan dos hipótesis: la nula ( $H_0$ : no hay asociación entre los anticuerpos antiplaquetarios y la trombocitopenia inmunitaria primaria) contra la alternativa ( $H_1$ : sí hay asociación entre los anticuerpos antiplaquetarios y la trombocitopenia inmunitaria primaria).

Como el valor de  $p$  obtenido en la prueba exacta de Fisher (0.712682) es mayor que el valor de  $\alpha$ , entonces se acepta la hipótesis nula, que plantea la no asociación entre los anticuerpos

**Cuadro 2.** Prueba de  $\chi^2$  para asociación entre anticuerpos antiplaquetarios y trombocitopenia inmunitaria

	Anticuerpos antiplaquetarios positivos	Anticuerpos antiplaquetarios negativos	Total
1	2	62	64
	1.84	62.16	
2	73	2,474	2,547
	73.16	2,473.84	
Total	75	2,536	2,611

Valor de  $p= 0.903$ . Nota: celdas con valores esperados menores de 5.

**Cuadro 3.** Prueba exacta de Fisher

	Anticuerpos antiplaquetarios positivos	Anticuerpos antiplaquetarios negativos	Total
1	2	62	64
2	73	2,412	2,485
Total	75	2,474	2,549

Valor de  $p=0.712682$ .

antiplaquetarios y la trombocitopenia inmunitaria primaria.

## RESULTADOS

Se obtuvieron 2,549 determinaciones para investigar anticuerpos antiplaquetarios en 1,650 mujeres y 899 hombres. De ellos, sólo 75 pruebas fueron positivas (dos en pacientes con trombocitopenia inmunitaria primaria y 73 en pacientes con trombocitopenia por otras causas). En un grupo de 64 pacientes con trombocitopenia inmunitaria primaria, los anticuerpos antiplaquetarios se reportaron sólo en 2 (3%).

## DISCUSIÓN

La aplicación de la citometría de flujo en el estudio de las plaquetas ofrece grandes ventajas sobre otros métodos de análisis, porque es el único hasta el momento que puede medir la extensión de la activación de plaquetas individuales y detectar subpoblaciones de plaquetas.<sup>8</sup> Las plaquetas pueden analizarse en su medio fisiológico, incluyendo eritrocitos y leucocitos, mismos que afectan la activación plaquetaria.<sup>9,10</sup> La manipulación mínima de las muestras evita interferencias por activación *in vitro* y reduce las posibles pérdidas de subpoblaciones de plaquetas.<sup>11,12</sup>

Además, es posible determinar el estado de activación de las plaquetas circulantes y las modificaciones específicas que ocurren en la

superficie celular como consecuencia de este proceso y puede detectarse incluso 1% del total de plaquetas en la muestra de sangre;<sup>13</sup> se necesitan pequeñas alícuotas de sangre (aproximadamente 2 µL) para evaluarlas.<sup>11</sup> No obstante, la citometría de flujo tiene limitaciones: se necesita un operador especializado, porque la preparación de las muestras es complicada, aunque los nuevos sistemas automatizados y el uso de programas de computación más sencillos simplifican el ensayo. Pero estos equipos son costosos, por lo que no están disponibles en la mayor parte de los centros hospitalarios;<sup>14</sup> además, las muestras de sangre deben procesarse en un intervalo de 45 minutos después de la extracción para evitar una posible activación ex vivo.<sup>11</sup>

## CONCLUSIONES

Los hallazgos de este estudio indicaron poca utilidad de la prueba de investigación de anticuerpos antiplaquetarios, mediante el método descrito, en el diagnóstico de trombocitopenia inmunitaria primaria; por ello, parece inútil seguir realizándola.

## REFERENCIAS

1. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 2009;113:2386-2393.
2. Keating GM.: Romiplostim: a review of its use in immune thrombocytopenia. *Drugs* 2012;72:415-435.
3. Pizzuto J, Ambriz R. Therapeutic experience in 934 adults with idiopathic thrombocytopenic purpura: multicentric trial of the Cooperative Latin American Group on hemostasis and thrombosis. *Blood* 1984;64:1179-1183.
4. Gómez-Almaguer D, Tarín-Arzaga L, Moreno-Jaime B, Jaime-Pérez JC, et al. High response rate to low-dose rituximab plus high-dose dexamethasone as frontline therapy in adult patients with primary immune thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2013;90:494-500.
5. Arigón-Pallás JM, Jiménez-Villa J. *Métodos de investigación clínica y epidemiológica*. 3<sup>a</sup> ed. Madrid: Elsevier, 2004.
6. Leon Gordis. *Epidemiología*. 3<sup>a</sup> ed. Madrid: Elsevier, 2005.
7. Szklo M, Nieto FJ. *Epidemiología intermedia. Conceptos y aplicaciones*. Madrid: Díaz de Santos, 2003.
8. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996;87:4925-4936.
9. Santos MT, Valles J, Marcus AJ, Safier LB, et al. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. A new approach to platelet activation and recruitment. *J Clin Invest* 1991;87:571-580.
10. La-Rosa CA, Rohner MJ, Rodino LJ, Benoit SE. Human neutrophil cathepsin G is a potent platelet activator. *J Vasc Surg* 1994;19:306-318.
11. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 1987;70:307-315.
12. Abrams C, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb Haemost* 1991;65:467-473.
13. Kestin AS, Ellis PA, Barnard MR, Errichetti A, et al. Effect of strenuous exercise on platelet activation state and reactivity. *Circulation* 1993;88:1502-1511.
14. Kestin AS, Valeri CR, Khuri SF, Loscalzo J, et al.: The platelet function defect of cardiopulmonary bypass. *Blood* 1993;82:107-117.