

Detección de autoanticuerpos antiplaquetarios por ELISA en pacientes con púrpura trombocitopénica autoinmune

Detection of antiplatelet autoantibodies by ELISA in patients with autoimmune thrombocytopenic purpura

Dra. Osiris Y. Paz Cruz^I; Dr. Antonio A. Bencomo Hernández^{II}; Dra. Belkis Barranco Peregrino^{III}; Dra. Neyda Fernández Franch^{IV}

I Especialista de I Grado en Medicina General Integral e Inmunología. Máster en Enfermedades Infecciosas. Profesor Instructor. Hospital Pediátrico Universitario Eduardo Agramonte Piña. Camagüey, Cuba. bbperegrino@iscmc.cmw.sld.cu

II Doctor en Ciencias Biológicas. Profesor Titular. Instituto de Hematología e Inmunología. Ciudad Habana, Cuba.

III Especialista de I Grado en Medicina General Integral. Máster en Medicina Tradicional y Natural. Profesor Asistente. Universidad de Ciencias Médicas de Camagüey. Camagüey, Cuba

IV Especialista de II Grado en Bioquímica Clínica. Máster en Ciencias de la Educación. Profesor Auxiliar. Universidad de Ciencias Médicas de Camagüey. Camagüey, Cuba.

RESUMEN

Fundamento: la presencia de autoanticuerpos antiplaquetarios de los isotipos IgG, IgA e IgM en pacientes con púrpura trombocitopénica autoinmune, así como, la distribución del patrón de inmunoglobulinas asociadas a las plaquetas en las fases aguda y crónica de la enfermedad. **Objetivo:** determinar la presencia de autoanticuerpos antiplaquetarios en pacientes con púrpura trombocitopénica autoinmune. **Método:** se realizó un estudio a través de un ELISA directo cualitativo en 100 pacientes. De ellos 66 con púrpura trombocitopénica idiopática, 47 clasificados como púrpura trombocitopénica idiopática crónica y 19 como púrpura trombocitopénica idiopática aguda. Se investigaron además 34 muestras de pacientes con trombocitopenia asociada a hemopatías malignas y a enfermedades autoinmunes. **Resultados:** se detectaron autoanticuerpos anti-plaquetarios en el 86.6 % de

los pacientes en fase aguda y en el 85.1 % de los pacientes en fase crónica de la enfermedad. Se obtuvieron resultados negativos en todos los casos que se encontraban en remisión de la enfermedad. Los autoanticuerpos de la clase IgG fueron los más encontrados. Los IgM fueron más frecuentes en los pacientes con enfermedad aguda y los IgA en los casos de enfermedad crónica. **Conclusiones:** el ELISA empleado es un método novedoso útil para el diagnóstico inmunohematológico de esta enfermedad, que permite además detectar todos los isotipos de los autoanticuerpos involucrados en la destrucción inmune de las plaquetas.

DeCS: PRUEBA DE ELISA; TROMBOCITOPENIA; AUTOANTICUERPOS; PLAQUETAS; EPIDEMIOLOGÍA DESCRIPTIVA.

ABSTRACT

Background: the presence of antiplatelet autoantibodies of the IgG, IgA and IgM isotypes in patients with autoimmune thrombocytopenic purpura, as well as the distribution of the immunoglobulin pattern associated with platelets during acute and chronic disease.

Objective: to determine the presence of antiplatelet autoantibodies in patients with autoimmune thrombocytopenic purpura. **Method:** the study was conducted through a direct qualitative ELISA in 100 patients. From them 66 with idiopathic thrombocytopenic purpura, 47 classified as chronic idiopathic thrombocytopenic purpura and 19 as acute idiopathic thrombocytopenic purpura. In addition 34 samples from patients with thrombocytopenia associated with malignant hemopathies and autoimmune diseases. **Results:** antiplatelet autoantibodies in the 86.6 % of patients in acute phase and in the 85.1 % of patients in chronic phase of the disease were detected. Negative results in all cases that were in remission of the disease were obtained. The autoantibodies of the IgG class were the most discovered. The IgM were more frequent in patients with acute disease and IgA in cases of chronic disease. **Conclusions:** this kind of ELISA is a useful novel method for the immunohematologic diagnostic of this disease, which may also detect all isotypes of autoantibodies involved in the immune destruction of platelets.

DeCS: ENZYME-LINKEK IMMUNOSORBENTASSAY; TROMBOCITOPENIA; AUTOANTIBODIES; BLOOD PLATELETS; EPIDEMIOLOGY DESCRIPTIVE.

INTRODUCCIÓN

Las trombocitopenias autoinmunes se producen debido a una destrucción periférica de las plaquetas, ocasionada por la presencia de autoanticuerpos sobre la membrana plaquetaria. La púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) es la más frecuente de estas formas de trombocitopenias. Actualmente se prefiere el término de púrpura trombocitopénica autoinmune (PTA) por expresar más claramente la patogénesis de este desorden hematológico. Además existen trombocitopenias autoinmunes secundarias a infecciones virales y parasitarias, al lupus eritematoso sistémico (LES), a enfermedades linfoproliferativas y a tumores malignos.¹

A pesar de que no se cuenta con datos precisos de la incidencia mundial de esta enfermedad, los estudios previos encontraron una incidencia de 6,6 por cada 100 000 habitantes. En los niños oscila entre cuatro a seis casos por cada 100 000 habitantes, es más frecuente en el sexo femenino que en el masculino con una proporción de 3:1 y con mayor frecuencia afecta a las mujeres en edad reproductiva.² La PTA de la infancia muchas veces aparece después de una infección viral; aunque también puede asociarse con la isoimmunización Rh y las cardiopatías congénitas.³ En los adultos es asociada comúnmente a conectivopatías, leucemias, cánceres no linfoides y al tratamiento con medicamentos.⁴ El diagnóstico de esta enfermedad se basa en la historia clínica, el examen físico, la biometría hemática y la observación del extendido de sangre periférica, no existe ninguna prueba que indique de forma absoluta el diagnóstico de la PTA. En muchas ocasiones se hace el diagnóstico por exclusión de otras causas de trombocitopenia.⁵ Existe diversas técnicas para la identificación tanto de anticuerpos fijados a las plaquetas como para los anticuerpos antiplaquetarios circulantes presentes en el suero.^{6,7} Los ensayos inmunoenzimáticos son sensibles y rápidos, pueden aplicarse en la investigación de las inmunoproteínas asociadas a las plaquetas. Además, su bajo costo, la no utilización de material radioactivo lo señalan como un método de elegir para estos estudios.⁸ En el trabajo se comunica la presencia de autoanticuerpos anti-plaquetarios de los isotipos Inmunoglobulina G (IgG), Inmunoglobulina A (IgA) e Inmunoglobulina M (IgM) a través de una técnica inmunoenzimática ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de tipo directo cualitativo en pacientes con PTA, así como la distribución del patrón de inmunoglobulinas asociadas a las plaquetas.

MÉTODO

Se realizó un estudio a través de un ELISA directo cualitativo en 100 pacientes. De ellos 66 con púrpura trombocitopénica idiopática, 47 clasificados como púrpura trombocitopénica idiopática crónica y 19 como púrpura trombocitopénica idiopática aguda. Se investigaron además 34 muestras de pacientes con trombocitopenia asociada a hemopatías malignas y a enfermedades autoinmunes. Permitted investigar la presencia de autoanticuerpos antiplaquetarios en muestras de sangre de pacientes con diagnóstico de PTA atendidos en el departamento de Inmunohematología del Instituto de Hematología e Inmunología. Las muestras analizadas se tomaron desde enero 2006 hasta enero 2008. El diagnóstico de PTA se realizó por la presencia en el hemograma de trombocitopenia inferior a $30\,000/\mu\text{L}$ y por el medulograma que mostró hiperplasia del sistema megacariopoyético.¹ Se consideró como PTA aguda en los pacientes adultos y los niños hasta los seis meses y el año, respectivamente, después del diagnóstico de la enfermedad y PTA crónica a los pacientes sin remisión después del tiempo considerado como PTA aguda.⁹ A todos los pacientes se les solicitó, mediante firma de documento, el consentimiento informado para participar en la investigación.

El universo estuvo constituido por 150 pacientes con diagnóstico de púrpura trombocitopénica, atendidos en el periodo en que se llevó a cabo la investigación, la muestra quedó conformada por 100 pacientes que acudieron con regularidad a las consultas de seguimiento. De ellos 66 con PTI, 47 clasificados como PTI crónico (PTI-c) y 19 como PTI aguda (PTI-a). En este grupo 58 pacientes fueron adultos (45 femeninos y 13 masculinos) y ocho niños (seis femeninos y dos masculinos). El rango de edad de los adultos fue de 20 a 69 años y de dos a 16 años para los niños. En el momento del estudio 24 pacientes se encontraban en remisión de la enfermedad (cuatro con PTI-a y 20 con PTI-c) con un recuento normal de plaquetas ($> 150 \times 10^9 /\text{L}$) y ocho pacientes (seis con PTI-c y 2 con PTI-a) recibían tratamiento inmunosupresor. Además muestras de 34 pacientes con trombocitopenia asociadas a otras enfermedades se analizaron con el empleo de un método inmunoenzimático para la detección de anticuerpos antiplaquetarios.¹⁰ Se consideró un resultado como positivo cuando la lectura a 405nm de la densidad óptica (DO) fue mayor a la media de los controles normales más tres desviaciones estándar.

Para la comparación de la distribución de los isotipos de inmunoglobulinas de los autoanticuerpos anti-plaquetarios entre los pacientes con PTI aguda y crónica se utilizó la

prueba Chi-cuadrado y se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Los datos se recolectaron en cuadernos elaborados al efecto en los que se vaciaron los resultados de la tira impresa por el equipo de lectura de DO de la placa ELISA. Se utilizó estadística descriptiva y por ciento desarrollado en tablas y gráfica.

RESULTADOS

Con respecto a los pacientes con PTI aguda y crónica se detectaron autoanticuerpos anti-plaquetarios en el 86.6 % y el 85.1 % respectivamente. Todos los pacientes con PTI aguda y crónica en los que se obtuvieron resultados negativos en el ELISA recibían tratamiento con prednisona en el momento del estudio. En ninguno de los casos en que se realizaron las investigaciones en período de remisión de la enfermedad se detectaron autoanticuerpos anti-plaquetarios. (Tabla 1)

Tabla 1. Detección de autoanticuerpos anti-plaquetarios por ELISA en pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática

Forma clínica	No. de casos detectados	Positivos (%)
PTI aguda	13 de 15	86.6
PTI aguda en remisión	0 de 4	
PTI crónica	23 de 27	85.1
PTI crónica en remisión	0 de 20	0

Fuente: historias Clínicas

Los autoanticuerpos de la clase IgG fueron los más frecuentes, detectándose como único patrón serológico en el 38.4 % de los pacientes con PTI-a y en el 34.78 % de los casos con PTI-c. En ambas formas clínicas de la PTI predominaron las combinaciones de autoanticuerpos de diferentes isotipos. El patrón de IgM como única inmunoproteína asociada a las plaquetas fue más frecuente en los pacientes con PTI-a. Sin embargo, la IgA sola se detectó únicamente en los pacientes con PTI-c así como la combinación de autoanticuerpos IgG, IgA e IgM. (Tabla 2)

Tabla 2. Patrón de inmunoglobulinas de los autoanticuerpos anti-plaquetarios detectados por ELISA en pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática

Patrón de Inmunoglobulinas	PTI aguda		PTI crónico	
	No. de pacientes	%	No. de pacientes	%
IgG	5	38.46	8	34.78
IgG, IgA	1	7.70	5	21.73
IgG, IgM	4	30.76		
IgG, IgA, IgM			4	17.40
IgA, IgM	1	7.70	2	8.70
IgA			3	13.05
IgM	2	15.38	1	4.34
Total	13	100	23	100

Fuente: historias Clínicas

El análisis de la presencia de autoanticuerpos por isotipos reveló que la IgA se encontró con mayor frecuencia (60.86 %) en los pacientes con PTI-c y la IgM (53.84 %) en los casos con PTI-a ($X^2=9.99$, $p= 0.006$). (Gráfico 1)

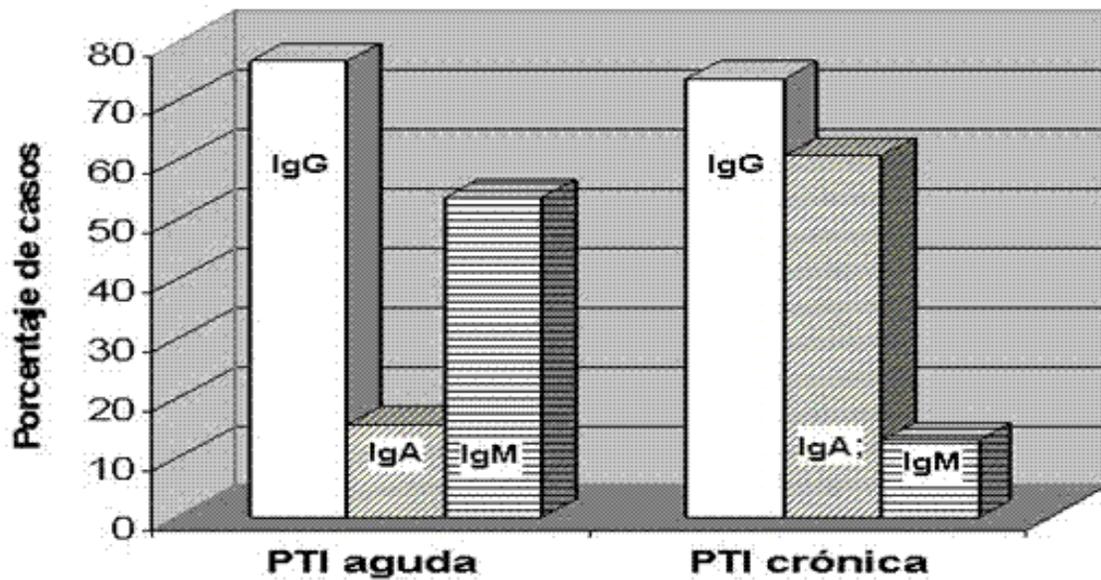


Gráfico 1. Patrón de inmunoglobulinas de los autoanticuerpos anti-plaquetarios detectados por ELISA en pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática

Con respecto a los pacientes con PTA asociada con otras enfermedades se demostraron autoanticuerpos anti-plaquetarios. Al igual que en los pacientes con PTI la IgG fue la clase de inmunoglobulina más frecuente que se demostró en 31 pacientes (91.1 %). Las combinaciones de autoanticuerpos de diferentes isotipos se detectaron en 20 (58.8 %) de los 34 casos estudiados. (Tabla 3)

Tabla 3. Autoanticuerpos anti-plaquetarios detectados por ELISA en 34 pacientes con púrpura trombocitopénica autoinmune asociada a otras enfermedades

Enfermedad	No. de casos	Patrón de inmunoglobulinas
Leucemia mieloide crónica y tto con INF	8	IgG, IgA
α	2	IgG
	1	IgA, IgM
Aplasia Medular	2	IgG, IgA
	2	IgG, IgA, IgM
	1	IgG
Leucemia linfoide crónica	1	IgG, IgA
	1	IgG
	1	IgM
	1	IgA
Lupus eritematoso sistémico	1	IgG
	1	IgG, IgA
	1	IgM
Síndrome mielodisplásico	2	IgG, IgA, IgM
	1	IgG
Síndrome de Evans-Fisher	2	IgG, IgA
	1	IgM
Mielofibrosis	1	IgG
	1	IgG, IgA, IgM
linfoma no Hodking	1	IgG
	1	IgG
Leucemia mielomonocítica crónica	1	IgG

Fuente: historias Clínicas

□

DISCUSIÓN

El porcentaje de positividad del 86.6 % y el 85.1 % encontrado en el estudio, en los pacientes con PTI aguda y crónica es similar a los descritos anteriormente con la técnica de

MAIPA (Monoclonal Antibody – specific Immobilisation of Platelet Antigens) informados por otros autores utilizando la técnica de inmunofluorescencia.⁹

Los resultados negativos encontrados en algunos pacientes con PTI pudieran explicarse, por encontrarse todos estos casos con tratamiento inmunosupresor que suprime la producción de anticuerpos.¹⁰ Otros factores podrían influenciar como la realización de los estudios en pacientes con diferentes tiempos de diagnóstico de la enfermedad.¹¹ En ninguno de los casos de PTI en remisión se encontró anticuerpos anti-plaquetarios, lo que es compatible con la fisiopatología de la enfermedad. En otros estudios hay autores que han encontrado casos positivos en pacientes con PTI-c en remisión. Esta positividad se relaciona con el riesgo de recaídas, o de desarrollar en el futuro alguna enfermedad autoinmune sistémica.¹² La IgG fue la clase de inmunoglobulina más frecuentemente encontrada tanto en la PTI aguda como en la crónica, lo que concuerda con lo informado en otros estudios.^{11,12} Los autoanticuerpos IgM se demostraron con mayor frecuencia en los pacientes con PTI-a y en dos casos esta fue la única inmunoglobulina detectada en las plaquetas. Otros autores encontraron resultados similares en los que no se demostró asociación entre el tiempo transcurrido entre el diagnóstico y la realización de los estudios.¹² La alta frecuencia de autoanticuerpos IgM en esta forma clínica pudiera deberse a una estimulación continua del sistema inmunológico por diferentes epítopes de los autoantígenos o por autoantígenos incapaces de generar respuestas de tipo IgG por sus características químicas.¹³ En la serie estudiada la frecuencia de autoanticuerpos IgA fue considerablemente mayor en los casos de PTI crónica y en tres casos esta fue la única clase de inmunoglobulina presente en la membrana plaquetaria. Este resultado concuerda con lo informado en otro estudio en los que se demostró únicamente IgA en las plaquetas del 17 % de los casos con PTI crónico.⁹ Estudios recientes explican la patogénesis de la PTI a través de la presentación por los macrófagos de antígenos crípticos localizados en la glicoproteína IIb/IIIa plaquetaria a las células cooperadoras linfocitarias del tipo T CD4+.¹³ De esta forma y similar a lo demostrado en la anemia hemolítica autoinmune (AHAI), la presencia de autoanticuerpos IgA podría explicarse por la presentación de secuencias específicas de péptidos crípticos que induzcan la secreción de factor de crecimiento tumoral (TGF- β) por las células cooperadoras linfocitarias del tipo CD4 con la subsiguiente producción de esta inmunoglobulina por la célula B.¹⁴ Este resultado nos sugiere que la presencia de IgA podría estar relacionada con una progresión a la cronicidad de la enfermedad.¹⁵

En todos los casos en que se sospechó trombocitopenia autoinmune secundaria se detectaron autoanticuerpos anti-plaquetarios. En los pacientes con LMC y tratamiento con interferón α . Cabe mencionar los efectos demostrados que tiene esta citocina en el sistema

inmune. Asociado al tratamiento con este fármaco se ha detectado autoanticuerpos involucrados en diferentes enfermedades autoinmunes dentro de las que se describe la PTA.¹⁶ El mecanismo de inducción de autoinmunidad, más invocado, es la diferenciación de las células CD4 en productoras de citocinas del tipo Th₁ por un aumento en la expresión de los receptores para la Interleucina 12 (IL-12) mediados por el interferón alfa (IFN α).¹⁵⁻¹⁷ Por otra parte se ha demostrado que el IFN α promueve la diferenciación de los monocitos a células dendríticas las cuales son capaces de procesar antígenos de células senescentes y presentarlos a las células CD4 y de esta forma inducir la producción de autoanticuerpos.¹⁸⁻²⁰ En la aplasia medular es conocido el componente autoinmune de esta enfermedad. Al respecto se ha demostrado en estudios "*in vitro*" la acción supresora de determinadas especificidades de anticuerpos anti-plaquetarios en la megacariopoyesis y en la fragmentación de los megacariocitos.²¹ No obstante, la contribución de estos anticuerpos en la patogénesis de esta enfermedad constituye un aspecto que merece ser más profundamente estudiado y avalado por trabajos que incluyan un número importante de casos en los que se pueda estudiar la especificidad de los autoanticuerpos anti-plaquetarios.

CONCLUSIONES

El ELISA empleado permitió la detección de los autoanticuerpos anti-plaquetarios en la mayoría de los pacientes con PTI y en todos los pacientes con trombocitopenia autoinmune secundaria, por lo que es un método útil para el diagnóstico inmunohematológico de la púrpura trombocitopénica autoinmune. Los autoanticuerpos anti-plaquetarios son predominantemente de la clase IgG, aunque en la mayoría de los casos de PTA se observó la coexistencia de autoanticuerpos de diferentes isotipos. Los autoanticuerpos anti-plaquetarios de la clase IgM son más frecuentes en pacientes con PTI aguda y los autoanticuerpos IgA en los pacientes con PTI crónica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Muñiz E. Púrpura trombocitopénica autoimmune. En: Pujol-Moix N, editor. Trombocitopenias. Madrid: Mosby/Doyma Libros; 1999.p.183-209.
2. Domínguez MV, Rodríguez H. Mecanismos celulares y bioquímicos involucrados en la fisiopatogenia de la púrpura trombocitopénica autoinmune. Gac Med Mex. 2002;

138:264-9.

3. Grupo de trabajo sobre púrpura trombocitopénica autoinmune de la sociedad española de hematología pediátrica. Protocolo de estudio y tratamiento de la púrpura trombocitopénica autoinmune. *An Esp Pediatr.* 1998; 44:623-31.
4. Karpatkin S. Autoimmune (idiopathic) thrombocytopenic purpura. *Lancet.* 2004; 349:1531-6.
5. Lee GR, Foerster J, Kukens J, Parasken F, Greer JP, Rodgers GM. *Wintrobe's clinical haematology.* 10 ed. Baltimore: Williams & Williams; 2002.
6. Westerman DA, Grigg AP. The diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults: does bone marrow biopsy have place. *MJA.* 2003; 170:216-7.
7. Kelton JG. The serological investigation of patients with autoimmune thrombocytopenia. *Thromb Haemost.* 2002; 74:228-33.
8. Grainger J, Bolton-Maggs P, Godeau B, Bussel J, Donato H, Elalfy M. Diagnosis and management of chronic ITP: comments from an ICIS expert group. *Annals of Hematology* [serial on the Internet]. 2010 [cited 2011 feb 23]; 89(11):[about 9 p.]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-010-0950-0>
9. Campbell K, Rishi K, Howkins G, Gilby D, Mushens R, Ghevaert C, et al. A modified rapid monoclonal antibody specific immobilization of platelet antigen assay for the detection of human platelet antigen (HPA) antibodies: a multicentre evaluation. *Vox Sanguinis.* 2007; 93:289-97.
10. Díaz M, Bencomo A, Castillo D, Levon R, Alfonso Y, Orbeal Lea. Desarrollo de ensayos inmunoenzimáticos para la detección de anticuerpos antiplaquetarios de las clases IgG, IgA e IgM. *Rev Arg Transf.* 2003; XXVIII:49-57.
11. Hou M, Stokelberg D, Kutti J, Wadenvik H. Immunoglobulins targeting both GP IIb/IIIa and GP Ib/IX in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP): evidence for at least two different IgG antibodies. *Br J Haematol.* 2006; 98:64-7.
12. Metclafe P. Platelets antigens and antibody detection. *Vox Sang.* 2006; 87:S82-S96.
13. Biglino P, Perutelli P, Man PG. Platelet antibody detection in pediatric immune thrombocytopenic purpura. Evaluation of three screening methods. *Vox Sang.* 2004; 72:242-7.
14. Cines D, Liebman H, Stasi R. Pathobiology of secondary immune thrombocytopenia. *Semin Hematol* [serial on the Internet]. 2009 [cited 2011 feb 23]; 46(1 Suppl 2):[about 7 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2682438/>.
15. Palau J, Jarque I, Sanz MA. Long-term management of chronic immune

- thrombocytopenic purpura in adults. *Int J Gen Med* [serial on the Internet]. 2010 [cited 2011 feb 23]; 3:[about 10 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2962326>
16. Altıntaş A, Pasa S, Cil T, Bayan K, Gokalp D, Ayyıldız O. Thyroid and celiac diseases autoantibodies in patients with adult chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Platelets* [serial on the Internet]. 2008 [cited 2011 feb 23]; 19(4):[about 10 p.]. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/full/10.1080/09537100801894651>.
 17. Semple JW, Drew Provan M, Garvey B, Freedman J. Recent progress in understanding the pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Current Opin Hematol*. 2010; 17:590.
 18. Bao W, Bussel JB, Heck S, He W, Karpoff M, Boulad N. Improved regulatory T-cell activity in patients with chronic immune thrombocytopenia treated with thrombopoietic agents. *Blood* [serial on the Internet]. 2010 Nov 25 [cited 2011 feb 23]; 116(22):[about 8 p.]. Available from: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/lookup/resid/116/22/4639?view=full.pdf&uritype=cgi>.
 19. Tomer A, Koziol J, McMillan R. Autoimmune thrombocytopenia: flow cytometric determination of platelet-associated autoantibodies against platelet-specific receptors. *J Thromb Haemost*. 2005; 3:74-8.
 20. Huiming Y, Yunfang L, Junqing H, Zhe Y, Wei S, Honghai D. TLR7 regulates dendritic cell-dependent B-cell responses through BlyS in immune thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*. 2011; 86:67.
 21. Chow L, Aslam R, Speck ER, Kim M, Cridland N, Webster ML. A murine model of severe immune thrombocytopenia is induced by antibody- and CD8+ T cell-mediated responses that are differentially sensitive to therapy. *Blood*. 2009; 115:1247.

Recibido: 4 de noviembre de 2009

Aprobado: 11 de junio de 2011

Dra. Osiris Y Paz Cruz. Email: bbperegrino@iscmc.cmw.sld.cu