

Caracterización de anticuerpos antiplaquetarios en pacientes con trombocitopenia inmune primaria

1

Adams-Villalón Y¹, Bencomo- Hernández A¹, Castillo-González D¹, González-Paredes A². Soler-Noda G¹, González-Hernández O¹, Aquino-Rojas S¹, Romero-Días Y¹

¹Instituto de Hematología e Inmunología; ²ICBP “Victoria de Girón”, La Habana, Cuba

Email: yamila.adams@infomed.sld.cu

RESUMEN

La trombocitopenia inmune primaria (PTI) es la enfermedad hematológica autoinmune más frecuente. Se caracteriza por un diagnóstico por exclusión, gran variabilidad en su curso clínico y respuesta al tratamiento. La presente investigación evaluó los parámetros de validación de un ensayo por citometría de flujo (CF) para la pesquisa de anticuerpos antiplaquetarios en pacientes con trombocitopenia inmune primaria. Estos anticuerpos fueron caracterizados según clases y especificidad y se determinó se existía relación con las variables clínicas en pacientes con PTI durante un estudio preliminar descriptivo de corte transversal realizado en el Instituto de Hematología e Inmunología entre junio 2014 – diciembre 2015. El 80 % de los pacientes incluidos en el estudio fueron positivos por citometría de flujo y por MAIPA; el 91,7 % de ellos con manifestaciones clínicas de leve a moderada. La especificidad más frecuente fue la glucoproteína GP IIb/IIIa presente en el 58,3 % de los pacientes y el 78,6 % de ellos tuvo conteo de plaquetas superior a $30 \times 10^9/L$. El 75 % de los casos presentó IgG y su combinación más frecuente fue con la IgM en un tercio de los casos. El total de pacientes que respondieron al tratamiento, presentaron anticuerpos positivos frente a una o dos especificidades. Conclusiones: No hubo relación entre las especificidades de los anticuerpos y fases de la enfermedad propuestas en el protocolo de consenso 2010 según tiempo de evolución y curso clínico. En los pacientes con menor número de especificidades fue mejor la respuesta al tratamiento. El isotipo IgG predominó en los anticuerpos frente a GP IIb/IIIa, relacionada con un conteo de plaquetas superior a $30 \times 10^9/L$ y una evolución favorable.

Palabras clave: trombocitopenia inmune primaria, anticuerpos antiplaquetarios, especificidad de anticuerpos.

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de la PTI primaria es complejo y continúa siendo de exclusión, ya que ningún parámetro clínico ni analítico aislado permite establecerlo con certeza.

En la patogenia de esta enfermedad están involucrados múltiples factores que generan un desorden inmunológico complejo cuyo mecanismo fisiopatológico central es la pérdida de la auto tolerancia a los antígenos propios localizados en la superficie de las plaquetas y los megacariocitos.

Los anticuerpos contra los antígenos plaquetarios desempeñan un papel importante y su detección puede ser un elemento orientador en el estudio y seguimiento de estos pacientes.

OBJETIVO

- Validar un ensayo para la detección de anticuerpos antiplaquetarios en pacientes con trombocitopenia inmune.
- Caracterizar los anticuerpos antiplaquetarios según clases y especificidad en pacientes con PTI de diferentes variantes clínicas y respuestas terapéuticas.

MATERIALES Y MÉTODO

Se realizó un estudio de tipo experimental en el laboratorio de Inmunoematología del IHI durante el período comprendido entre enero-diciembre del 2015; para la evaluación de los parámetros de validación de un inmunoensayo para la determinación de AAP por CF. Se empleó como criterio de la verdad los casos con diagnóstico clínico de trombocitopenias inmunes, no inmunes y donantes de plasma y plaquetas. Además, se utilizó la IF con lectura por microscopía como método adicional de referencia.

Una vez validado el ensayo se realizó un Estudio descriptivo preliminar de corte transversal en pacientes portadores de PTI con anticuerpos antiplaquetarios (AAP) positivos atendidos en consulta de hemostasia del Instituto de Hematología e Inmunología (IHI) durante el período comprendido entre junio de 2014 y diciembre de 2015.

Incluidos solo pacientes clasificados en cuanto a fases de la enfermedad y respuesta al tratamiento en consulta de hemostasia, sin antecedentes de transfusiones o embarazos, con el consentimiento informado por escrito a participar en el estudio. Se excluyeron pacientes que hayan recibido tratamiento con inmunosupresores en los 30 días anteriores al estudio o con diagnóstico de PTI durante el embarazo.

Procedimiento: Para la detección e identificación de las clases y la especificidad de los AAP, se utilizaron las muestras de sangre total con EDTA al 5 % de los 24 pacientes que fueron incluidos en el estudio. Para ello se desarrolló el ensayo MAIPA en muestras una vez fue identificada la presencia de AAP por citometría de flujo.

Se utilizó en el análisis estadístico el programa SPSS versión 21 para Windows.

Las variables en estudio se expresaron según sus respectivas medidas de resumen: media y desviación estándar para las cuantitativas, frecuencias absolutas y relativas para las cualitativas.

Se empleó el test Ji Cuadrado de Independencia para establecer asociación entre variables; el test de comparación de proporciones (Z) para estimar diferencias proporcionales entre dos grupos y el Coeficiente de Correlación lineal para estimar la correlación de variables categóricas (Spearman).

En todos los casos se trabajó prefijándose una zona crítica o de rechazo (alfa) de 0,05.

RESULTADOS

Evaluación de parámetros de validación: En la presente investigación las muestras positivas correctamente identificadas por CF fueron de un 90,0 % vs 66,7 % por microscopía. Estos resultados son similares a los publicados por otros investigadores que coincidieron en que la CF presenta una sensibilidad entre el 70 y 95 %, y por lo tanto, en este sentido es superior a la microscopía para apoyar el diagnóstico de la PTI.

El porcentaje de muestras negativas correctamente identificadas a través del método por CF fue del 82,9 % frente al 97,1 % que presentó el método de referencia, la aparición de falsos positivos por CF entre los casos de trombocitopenias no inmunes y sujetos sanos, puede deberse a la

detección de verdaderos AAP como evidencia de fenómenos autoinmunes o la autoinmunidad fisiológica, pero que son irrelevantes en la inmunopatogenia de una PTI, por tener subsistemas de regulación propios.

La CF mostró un mejor VPN que VPP. Mediante la CF, la probabilidad que tiene un individuo de no presentar una PTI, cuando en la prueba no se detectan AAP es del 90,6 %, contra el 77,3 % de la microscopía.

Además de las pruebas directas a las 65 muestras del panel se les realizó prueba indirecta a los 30 pacientes con diagnóstico clínico PTI primaria 19 resultaron positivos. Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura de la presencia de autoanticuerpos circulantes hasta del 80 % de los pacientes con PTI sin previa aloinmunización.

En la presente investigación la CF presentó una eficacia de 86,2 %, superior a la del ensayo de referencia, que fue del 83,1 % y entre ambos métodos la concordancia fue $Kappa=0,39$, que se califica como “regular”. Estos resultados se deben a que la CF de flujo es un método mucho más sensible y objetivo que la microscopía para identificar anticuerpos antiplaquetarios en trombocitopenias inmunes.

Características clínico-demográficas de la población estudiada

La población estudiada mostró ligero predominio del sexo femenino para un 58,3 % del total, un rango de edades entre 5 meses y 74 años, con un promedio de 29,9 años con $\pm 23,6$ años; siendo mayores de 18 años más del 50 % del total. El 79,2 % de los pacientes incluidos fueron de color de piel blanca. La mayoría de los pacientes se encontraban en fase crónica de la enfermedad con síntomas de leve a moderados y manifestaciones clínicas cutáneo-mucosas.

Correlación entre las características de los anticuerpos y variables clínicas

No hubo relación estadísticamente significativa entre número de las especificidades y las fases de la enfermedad (figura).

Del total de pacientes no tratados incluidos en el estudio, sus muestras fueron positivas frente a una o dos especificidades, la mayoría son de reciente diagnóstico y las manifestaciones clínicas son leves a moderadas. Al evaluar a los pacientes que tuvieron respuesta al tratamiento, el 100 % tuvo anticuerpos positivos frente a una o dos especificidades, lo que evidencia asociación entre una mejor respuesta al tratamiento y un número menor de especificidades de anticuerpos (figura).

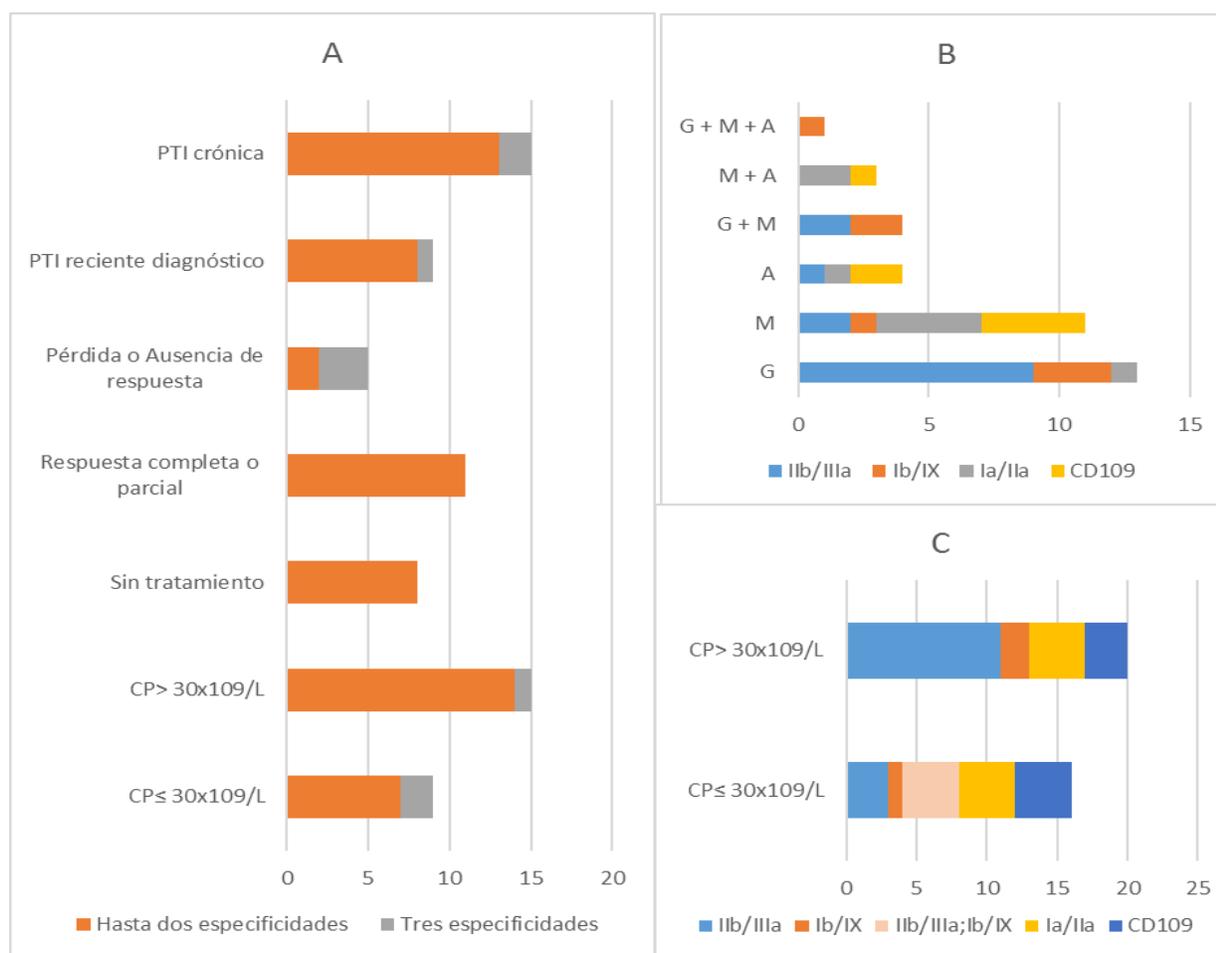


Figura. Principales relaciones entre la especificidad de los anticuerpos y las variables clínicas. A) Número de especificidades de anticuerpos y variables clínicas B) Tipo de especificidades e isotipos de anticuerpos C) tipo de especificidades de anticuerpos y conteo de plaquetas

Por otra parte, entre los pacientes sin respuesta o tuvieron pérdida de respuesta, el 60 % de ellos tuvieron anticuerpos positivos frente a tres especificidades, estos resultados sugieren que el número de especificidades de los anticuerpos antiplaquetarios podrían ser útiles en el pronóstico de la enfermedad (figura).

En el presente estudio se observó que las glicoproteínas GP IIb/IIIa, GPIa/IIa, GP Ib/IX y CD109 fueron las dianas más frecuentes de estos anticuerpos, representadas en 58,33 %; 33,3 %; 29,16 %; y 29,16 % de los casos, respectivamente. La presencia de IgM como única clase de inmunoglobulina, se asoció con mayor frecuencia a las GPIa/IIa y CD109, que con regularidad no son las especificidades que predominan en la respuesta de pacientes de reciente comienzo; mientras que IgM junto a la IgG se presentó frente a las GP IIb/IIIa y Ib/IX (figura).

Así mismo, en el predominio de IgG sola para la GP IIb/IIIa, se pone de manifiesto el cambio de clase y la maduración de la producción de anticuerpos en el tiempo. La presencia de IgA tuvo más asociada a las GPIa/IIa y CD109 que frente a GP IIb/IIIa y Ib/IX (figura).

La mayor frecuencia de detección de anticuerpos frente a la GP IIb/IIIa en la muestra estudiada se asoció a una respuesta favorable al tratamiento o a la respuesta espontánea. La respuesta al tratamiento incompleta o la pérdida de ella, se relacionó a la combinación de GP IIb/IIIa+Ib/IX y a CD109. La GP Ia/IIa fue diana de anticuerpos con mayor frecuencia en los casos de reciente diagnóstico, en los mayores de 18 años y en su presencia se encontró un predominio de respuesta al tratamiento o espontánea.

La mayor frecuencia de detección de anticuerpos frente de la GP IIb/IIIa en la muestra estudiada se asoció a un conteo de plaquetas superior a $30 \times 10^9/L$.

En pacientes donde se identifican anticuerpos frente a GPIb/IX hay un menor conteo de plaquetas en relación a otras especificidades (figura).

CONCLUSIONES

- La citometría de flujo muestra parámetros superiores de sensibilidad, VPN y eficacia; resultó menos específica con disminución de los VPP en relación a la microscopia para la detección

de anticuerpos antiplaquetarios; con indicadores de validación acordes con los criterios internacionales para este tipo de método.

- Los autoanticuerpos antiplaquetarios en su mayoría son de la clase IgG, concomitando con la IgM en más de la mitad de los casos. La presencia de IgA no es infrecuente.
- La glucoproteína GP IIb/IIIa fue la diana más frecuente de reconocimiento de los autoanticuepos antiplaquetarios. El isotipo IgG predominó en los anticuerpos frente a GP IIb/IIIa; y las muestras con esta especificidad se relacionaron en su mayoría con un conteo de plaquetas superior a $30 \times 10^9/L$.
- No hubo relación entre las fases de la enfermedad y las especificidades de los anticuerpos
- Hubo buena respuesta al tratamiento en la mayoría de los pacientes con anticuerpos de hasta dos especificidades.

RECOMENDACIONES

- 1) Realizar un estudio longitudinal con una muestra mayor de casos para seguimiento de la evolución clínica e inmunológica de los pacientes.
- 2) Realizar un diseño de MAIPA utilizando plaquetas del paciente.

Bibliografía

1. Barnett D, Louzao R, Gambell P, De J, Oldaker T, Hanson CA, et al. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - part IV - postanalytic considerations. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013 Sep-Oct;84(5):309-14. doi: 10.1002/cyto.b.21107.
2. Wu GG, Kaplan C, Curtis BR, Pearson HA. Report on the 14th International Society of Blood Transfusion Platelet Immunology Workshop. *Vox Sang.* 2010 Nov;99(4):375-81. doi: 10.1111/j.1423-0410.2010.01348.x.
3. Grimaldi D, Canouï-Poitaine F, Croisille L, Lee K, Roudot-Thoraval F, Languille L, et al. Antiplatelet antibodies detected by the MAIPA assay in newly diagnosed immune thrombocytopenia are associated with chronic outcome and higher risk of bleeding. *Ann Hematol.* 2014 Feb;93(2):309-15. doi: 10.1007/s00277-013-1855-5..

4. Liu XF, Xue F, Zhang L, Zhou XL, Liu YZ, Liu W, et al. Relationship between the expression of autoantibodies against platelet membrane glycoprotein and therapeutic effect in primary immune thrombocytopenia. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2013 Jul;34(7):610-3. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2013.07.011.
5. Grimaldi-Bensouda L, Nordon C, Michel M, Viallard JF, Adoue D, Magy-Bertrand N, et al. Immune thrombocytopenia in adults: a prospective cohort study of clinical features and predictors of outcome. *Haematologica*. 2016 Sep;101(9):1039-45. doi: 10.3324/haematol.2016.146373.

