

Vol. 12 N°4

Octubre 2001

Análisis Plaquetario por Citometría de Flujo

Dra. Carmen Cao P.

*Departamento de Hemato-Oncología, Laboratorio de Citometría de Flujo,
Clínica Las Condes*

(Con la colaboración de la Dra. M. Valeska Simon)

Desde hace ya mucho tiempo la Citometría de Flujo se viene aplicando al estudio de las células sanguíneas. En la actualidad ha cobrado especial relevancia el estudio de las plaquetas por esta segura, acuciosa, precisa y rápida metodología. Si bien, en una primera instancia se ha reservado esta posibilidad a los laboratorios de investigación, hoy en día es factible aplicar estas técnicas para su utilidad clínica.

Las plaquetas de por sí tienen ciertas características que las hacen susceptibles de estudio por Citometría de Flujo resultando de gran valor clínico en diferentes patologías. Además se suma una ventaja adicional a la identificación inmunofenotípica de las plaquetas, cual es su caracterización estructural y su análisis funcional. Dentro de las aplicaciones más utilizadas se encuentran las siguientes:

- * Diagnóstico de trombocitopatías.
- * Detección de inmunoglobulinas asociadas a plaquetas.
- * Enumeración de plaquetas reticulares
- * Estudio de la activación plaquetaria

Existe una gama bastante amplia de anticuerpos monoclonales capaces de identificar glicoproteínas plaquetarias. Por ejemplo, el diagnóstico del Síndrome de Bernard-Soulier o de la Trombastenia de Glanzman puede realizarse en forma rápida en base a la ausencia de expresión antigénica en la membrana plaquetaria de CD42 (gp Ib) y CD41 (gpIIb/IIIa), respectivamente.

En los estudios de activación plaquetaria, los anticuerpos monoclonales se dirigen frente a glicoproteínas, que durante la activación modifican su expresión antigénica a nivel de la membrana plaquetaria, tal es el caso de CD62, CD63, CD69, CD41, CD42, etc., situaciones clínicas que presentan "in vivo" mayor riesgo de eventos trombofílicos.

La detección de inmunoglobulinas asociadas a plaquetas nos permite identificar la existencia de anticuerpos antiplaquetarios. En gran número de situaciones clínicas se sospecha la presencia de estos anticuerpos y es dificultoso detectarlos con otras aproximaciones metodológicas. La Citometría de Flujo no solamente permite su detección, sino que además tiene algunas ventajas, ya que permite la identificación específica de las plaquetas, por lo cual la presencia de otras células no interfiere en los resultados. El estudio de las plaquetas es de forma individual, lo que permite identificar diferentes subpoblaciones y brinda de esta manera información cualitativa y cuantitativa. Por Citometría de Flujo además se pueden realizar marcajes múltiples, lo que unido a la sensibilidad de la técnica, aporta objetividad y rigurosidad estadística. En otro plano, se sabe que la identificación de parámetros que colaboren a la predicción de la recuperación medular tras la quimioterapia, o al grado de producción hematopoyética por parte de la médula ósea, es de gran interés clínico. De ahí que la identificación de plaquetas reticuladas podría en cierta forma reflejar el estado de la megacariocitopoyesis. Es así, que a través de la medición del ARN plaquetario se han podido identificar plaquetas "reticuladas", lo que sugiere liberación reciente de plaquetas jóvenes al torrente sanguíneo.

El recuento plaquetario sanguíneo, en trombocitopenias de origen desconocido o inducidas por fármacos, podría ser de gran utilidad al diagnóstico diferencial.

En términos generales, el espectro de análisis de las plaquetas por Citometría de Flujo,

se basa en la caracterización de anomalías plaquetarias específicas, relacionadas con:

- * una determinada enfermedad o diagnóstico de desórdenes plaquetarios.
- * el control de las intervenciones terapéuticas dirigidas a las plaquetas.

El análisis del recuento plaquetario y del volumen celular se basa en 4 tipos diferentes de ensayos, con fines diagnósticos:

1. Análisis de plaquetas activadas "ex vivo" y reactividad plaquetaria en respuesta a la estimulación "in vitro", basada en el análisis de transducción de señales, estructuras del citoesqueleto, secreción y degranulación, conformación de las glicoproteínas, fosfolípidos de membrana, unión a los factores de coagulación y formación de micropartículas.
2. Análisis de defectos congénitos y adquiridos de la función hemostática, basado en la unión de superficie a las proteínas de la cascada de la coagulación, siguiendo la estimulación in vitro y la identificación de los defectos y deficiencias de glicoproteínas.
3. Caracterización del estado madurativo, basado principalmente en el contenido de ARN, en combinación con el volumen y recuentos plaquetarios.
4. Detección, cuantificación y caracterización de anticuerpos plaquetarios directos (Figura 1).

TEST DIRECTO

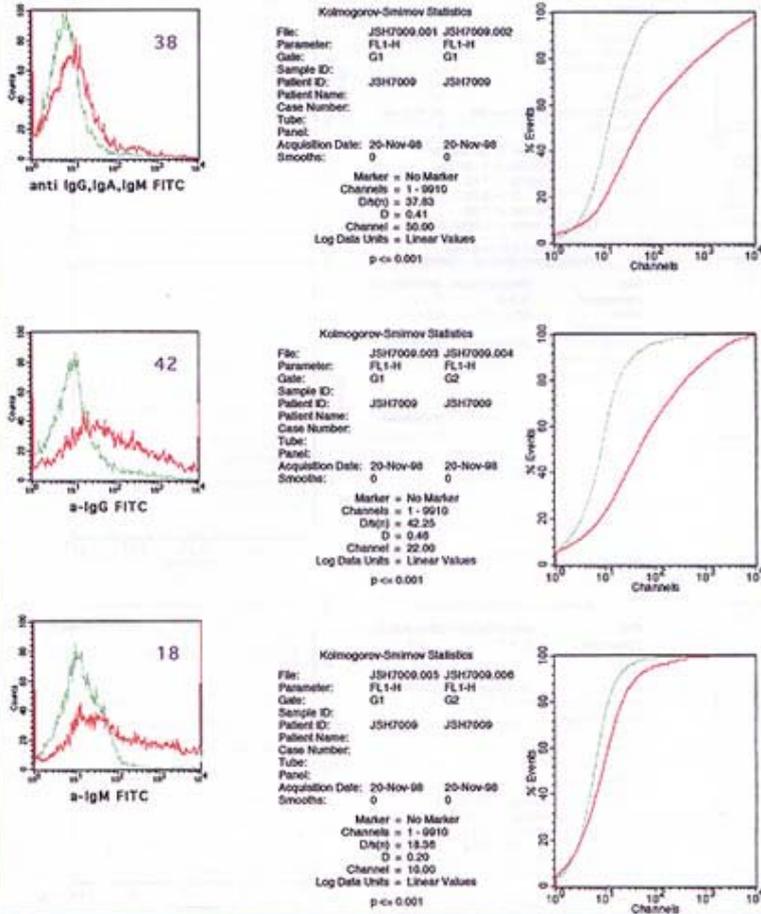
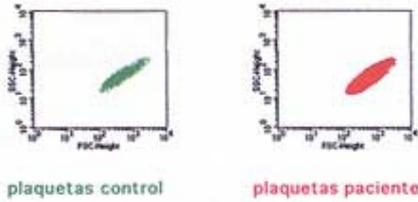
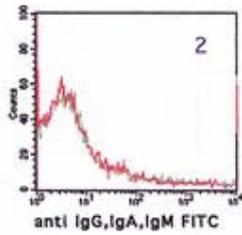


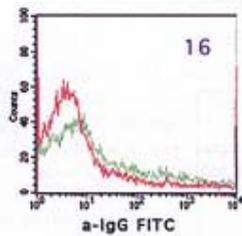
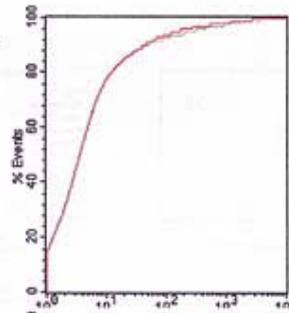
Figura 1
 Paciente portador de Púrpura Trombocitopénica Idiopática: Anticuerpos plaquetarios anti-IgM y anti-IgG positivos.

Plaquetas del paciente
vs plasma control
vs plasma del paciente

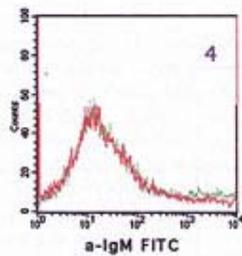
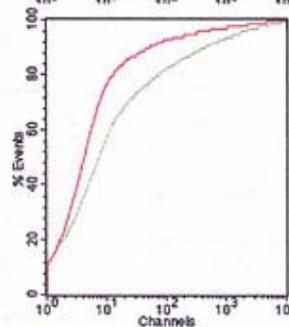
TEST INDIRECTO



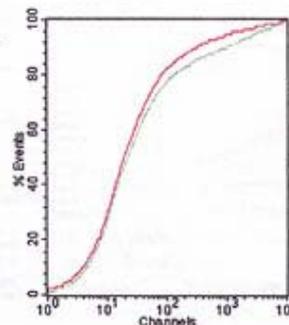
Kolmogorov-Smirnov Statistics
File: JSH7009.007 JSH7009.008
Parameter: FL1-H FL1-H
Gate: G1 G1
Sample ID:
Patient ID: JSH7009 JSH7009
Case Number:
Tube:
Panel:
Acquisition Date: 20-Nov-98 20-Nov-98
Smooths: 0 0
Marker = No Marker
Channels = 1 - 9910
Dh(n) = 1.62
D = 0.02
Channel = 3.00
Log Data Units = Linear Values



Kolmogorov-Smirnov Statistics
File: JSH7009.009 JSH7009.010
Parameter: FL1-H FL1-H
Gate: G1 G1
Sample ID:
Patient ID: JSH7009 JSH7009
Case Number:
Tube:
Panel:
Acquisition Date: 20-Nov-98 20-Nov-98
Smooths: 0 0
Marker = No Marker
Channels = 1 - 9910
Dh(n) = 16.49
D = 0.20
Channel = 7.00
Log Data Units = Linear Values
p <= 0.001



Kolmogorov-Smirnov Statistics
File: JSH7009.011 JSH7009.012
Parameter: FL1-H FL1-H
Gate: G1 G1
Sample ID:
Patient ID: JSH7009 JSH7009
Case Number:
Tube:
Panel:
Acquisition Date: 20-Nov-98 20-Nov-98
Smooths: 0 0
Marker = No Marker
Channels = 1 - 9910
Dh(n) = 4.11
D = 0.05
Channel = 220.00
Log Data Units = Linear Values
p <= 0.001



El análisis plaquetario, como célula aislada, es útil para la caracterización de anomalías plaquetarias: *primarias* y *secundarias*. El ensayo se puede realizar independientemente del recuento plaquetario, tanto en trombocitopenias, como en recuentos celulares elevados, si se ejecuta en las condiciones apropiadas (ej: buena saturación del anticuerpo monoclonal).

Por otro lado, la caracterización cuantitativa de las anomalías plaquetarias, permite el monitoreo de seguimiento durante la terapia.

El valor de la Citometría de Flujo en este análisis se ha establecido para los siguientes desórdenes:

- * *Síndromes pretrombóticos*: estudios de activación plaquetaria (Diabetes Mellitus, Síndrome Antifosfolipídico, Drogas).
- * *Defectos vasculares*: activación plaquetaria (Arterioesclerosis, Infarto Miocárdico, Angioplastia, Implantación de Injertos Vasculares).

- * *Defectos congénitos:* Ausencia de glicoproteínas (Trombastenia de Glanzmann, Síndrome de BernardSoulier); Déficit del pool de almacenamiento.
- * *Desórdenes de la función hemostática de Las plaquetas:* (Síndromes Mieloproliferativos o Mielodisplásicos, Insuficiencia renal terminal o secundaria a circulación extracorpórea, ejercicios extremos, efectos secundarios a drogas o transfusiones plaquetarias).
- * *Monitoreo de terapia antitrombótica plaquetaria.*
- * *Púrpura trombocitopénico idiopático o secundario a drogas:* disminución de la trombopoyesis (citostáticos, diuréticos tiazídicos estrógenos, infiltración maligna de la médula ósea).
- * *Trombocitopenia Inmune, Preeclampsia, Sepsis:* Aumento de la trombopoyesis; monitoreo de la respuesta medular a los factores de crecimiento hematopoyético.
- * *Procesos Alo o Autoinmunes:* Trombocitopenia neonatal, refractariedad a transfusiones; trombocitopenia inducida por heparina tipo 2.

Bibliografía

1. Besson I, George F, Sampol J. Assessment of the Platelet Membrane Glycoproteins using a standardized quantitative approach by flow cytometry. *Br J of Haematology* 1996; 93 Suppl. 2-176.
2. Bodensteiner DC. A flow cytometric technique to accurately measure post-filtration white blood cell counts. *Transf* 1989; 29: 651-3.
3. Dzik W, Ragosta A, Cusack W. *Vox Sang* 1990; 59: 153-59.
4. Dzik WH. (1989) *Leucocyte-poor platelet products*, in McCarthy LJ, Baldwin ML (eds): *Controversies of Leukocyte-poor Blood and Components*. Arlington, American Association of Blood banks, 1989, 49-80.
5. Freedman J, Lazarus A. *Applications of Flow Cytometry in Transfusion Medicine*. *Trans Med Reviews* 1995; Vol IX, N°2: 87-109.
6. Kao KJ, Scornik JC. Accurate quantitation of the low numbers of white cell-depleted blood components. *Transf* 1989; 29: 774-8.
7. Michelson A. *Flow Cytometry: A Clinical Test of Platelet Function*. *Blood* 1996; 87: 4925-36.
8. Poncelet P, George F, Papa S and T Snza F. Quantitation of hemopoietic cell antigens in Flow Cytometry, *Eur J Histochem* 1996; 40/Suppl. 1; 15-32.
9. Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S et al. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus Protocol for the Flow Cytometric Characterization of Platelet Function. *Thromb Haemost* 1998; 79: 885-96.
10. Comparative studies on the antiplatelet effects of a humanized anti-platelet glycoprotein IIb/IIIa antibody (YM337) and Reo Pro under flow conditions. *Thromb Haemost* 1998 Jul; 80(1): 28-31 (ISSN: 0340-6245).
11. Thrombosis and shock induced by activating antiplatelet antibodies in human Fc gamma RIIA transgenic mice: the interplay among antibody, spleen, and Fc receptor. *Blood* 2000 Dec 15;96(13):425440 (ISSN: 0006-4971).

